

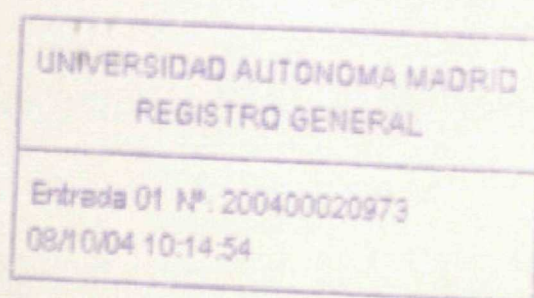
N/ TESIS/ 2753

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**

**IMPLICACIÓN DEL CD5 EN LA  
LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA DE  
CÉLULA B (LLC-B)**



**GEMA PÉREZ CHACÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**Madrid, 2004**

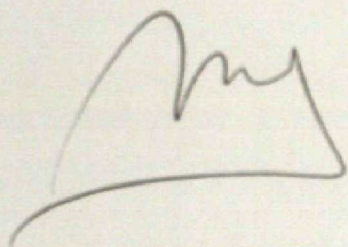
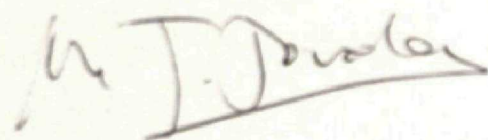
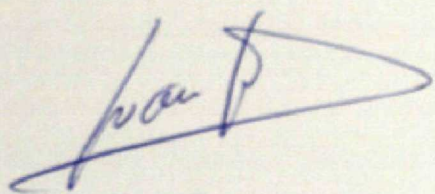
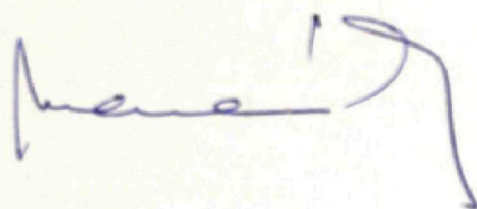
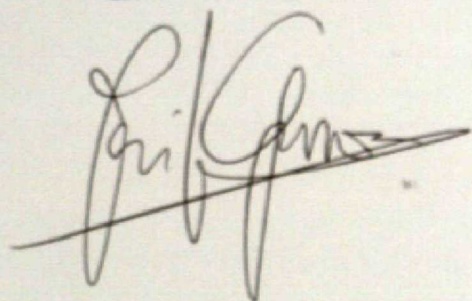
BIBLIOTECA FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Reg FM: 24670



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de SECRETAMENTE CUM LAUDE (UNANI-  
Madrid, 10/enero/2005  
MIDAD)

A stylized, handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping 'M' shape followed by a horizontal line.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. J. Dávalos'.A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Juan P.'.A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Manuel'.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. J. Gómez'.



**GEMA PÉREZ CHACÓN**

**TÍTULO:** IMPLICACIÓN DEL CD5 EN LA LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA DE CÉLULA B (LLC-B).

**DIRECTORES:** **Dra. PALOMA PÉREZ ACIEGO DE MENDOZA.** DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. DIRECTORA DEL LABORATORIO DE LA FUNDACIÓN LAIR.

**Dr. JUAN ANTONIO VARGAS NÚÑEZ.** PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE ADJUNTO DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MADRID.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

2004



INFORME EMITIDO POR LA DRA. PALOMA PÉREZ ACIEGO DE MENDOZA, DIRECTORA DEL LABORATORIO DE LA FUNDACIÓN LAIR, Y POR EL DR. JUAN ANTONIO VARGAS NÚÑEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, COMO DIRECTORES DEL TRABAJO

## **“IMPLICACIÓN DEL CD5 EN LA LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA DE CÉLULA B (LLC-B)”**

QUE PRESENTA DÑA. GEMA PÉREZ CHACÓN COMO TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR.

La leucemia linfóide crónica de células B es una neoplasia caracterizada por una expansión clonal de linfocitos B maduros que expresan CD5. Clínicamente algunos pacientes presentan un desarrollo lento de la enfermedad frente a otros con enfermedad progresiva y resistente a tratamiento. Actualmente se piensa que esta heterogeneidad se debe a la diferente capacidad de respuesta frente a antígeno de las células tumorales. Se sabe que la respuesta frente antígeno depende de la funcionalidad del receptor específico de antígeno (BCR), así como de señales adicionales de glicoproteínas moduladoras asociadas a éste. Entre éstas se encuentra el CD5, que funciona como un regulador negativo de la señalización BCR.

En este trabajo se estudió si la molécula CD5 podía estar relacionada con la expansión clonal que caracteriza a esta patología y/o con las distintas formas de presentación de la enfermedad. Para ello se realizaron una serie de ensayos *in vitro* en los cuales se analizó cómo afectaba el alejamiento del CD5 a la señalización BCR de los linfocitos B de la LLC. Se observó que, a diferencia de las células control, las señales de viabilidad, apoptosis o proliferación en respuesta a estímulos anti-BCR, no resultaban afectadas por la ausencia de CD5 en las células tumorales. Esto parecía indicar que CD5 no ejerce un efecto inhibitorio sobre la señalización BCR en estas células, hecho que puede estar relacionado con la expansión tumoral.

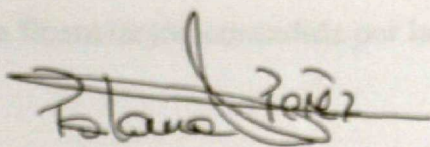


Sin embargo, esta falta de modulación no parecía debida a defectos en la vía de señalización de CD5, puesto que anticuerpos anti-CD5 inducían apoptosis y/o viabilidad según la dosis de anticuerpo empleada. CD5 era capaz de disparar eventos inmediatos de activación como la fosforilación de proteínas tirosina quinasa y la posterior inducción de la proteína antiapoptótica Mcl-1, por una vía dependiente de la activación de la proteína quinasa C. Por otra, parte esta señalización de CD5 también disparaba la producción de IL10, citocina inmunomoduladora que podría participar también en el mantenimiento de la viabilidad de las células tumorales.

Este estudio aporta datos novedosos respecto a la biología de los linfocitos B de la LLC, en concreto se describe por primera vez que la señalización positiva a través de CD5 puede participar en el mantenimiento de la viabilidad de estas células tumorales. A su vez, se presentan datos que pueden ser de utilidad en la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas, o bien en la mejora de las utilizadas en la actualidad. El planteamiento del trabajo, así como la exposición de resultados y conclusiones, se presentan de forma clara y correcta en la memoria.

Por todo lo expuesto anteriormente, consideramos que el trabajo presentado por Dña.Gema Pérez Chacón, realizado bajo nuestra dirección, reúne las condiciones de contenido, metodológicas y formales adecuadas para ser admitido como Tesis para optar al grado de Doctor por el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y ser públicamente defendido ante el Tribunal que proceda.

Madrid, 5 de octubre de 2004



Fdo: Paloma Pérez Aciego de Mendoza



Juan A. Vargas Núñez



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de la Fundación LAIR, gracias a la financiación concedida por la misma entidad.



*A mis padres y a mi hermano*



*La Ciencia es como la Tierra; sólo se puede poseer un poco de ella.*  
*François Marie Arouet Voltaire*



Cuenta la leyenda que la Tierra clamaba por abandonar su soledad, soledad que duraba ya millones de años. Cuenta la leyenda que la Tierra se encolerizó y que de lo más profundo de sus entrañas surgió el Mar, que tras una encarnizada lucha la Tierra exhaló y de esa exhalación brotó el Viento, que el Viento se enfureció por ser despertado y de su furia nació el Fuego. Cuenta la leyenda que, tras una eternidad de interminables disputas, Tierra, Mar, Viento y Fuego aprendieron a convivir. Cuenta la leyenda que de esa unión surgió la Vida.

Y pasaron años, siglos, milenios, y hubo un momento en que nuestra memoria empezó a recordar, un momento en el que ellos estaban allí, surgidos de la nada. Al principio eran pocos y vivían en completa armonía. Pero pronto fueron más. De la Madre surgieron los hijos y llegó el día en que los hijos quisieron liberarse, y egoístamente se volvieron contra aquélla que les había regalado la vida. Quisieron apoderarse de su sabiduría, de todos los secretos hasta entonces guardados con tanto celo. Y presintiendo su final, la Madre, consciente de su debilidad y del poco tiempo que le restaba, se levantó de su lecho y se dirigió hacia su destino. Recorrió caminos sin fin y cruzó ríos de eterna profundidad y, cuando por fin avistó la montaña, la Tierra se tornó sombría. Cuando la Madre encumbró la cima, juntó sus manos y las alzó hacia el cielo, negro como la misma oscuridad. Abrió las manos lentamente y de su interior brotó una luz, tan inmensa como el Universo. —Huye, huye hasta que lleguen a comprender— clamó en voz alta—. De la luz brotó luz y el cielo se tiñó de rojo intenso, la luz se esparció hasta el último confín conocido y por conocer y la oscuridad se hizo de nuevo. Tan sólo quedó una piedra, roja como el fuego y brillante como la vida. A su lado, el cuerpo inerte de la Madre.



Llevábamos varios días caminando, cruzando bosques, ríos y montañas. No sabía muy bien hacia dónde nos dirigíamos pero algo me decía que llevábamos la dirección correcta. Mi corazón no podía equivocarse, volvía a tener esa sensación que tantas veces me había invadido cuando era tan sólo una niña. Mi hermano siempre me decía que era un don, que si seguía mi instinto llegaría allí donde me propusiese. De vez en cuando no podía evitar mirar hacia atrás, mi pensamiento aún evocaba la última imagen de mi familia, antes de que la comitiva abandonase el poblado.

Todavía absorta en mis pensamientos, alcé la mirada y observé las vastas montañas que se erigían ante mí. Me paré, respiré profundamente y continué la marcha, allí detrás me esperaba mi destino.

Ya casi no recuerdo cómo empezó todo, fue el día en que quise saber qué había al otro lado del pueblo, más allá de los límites prohibidos. Nunca podía estar parada y eso me costaría más de un disgusto. No sé cómo pero me encontré escalando una montaña, y a partir de ese momento sólo recuerdo la luz, brillante, y del color rojo más intenso que ningún ser vivo jamás haya visto. Me atrajo hacia ella y ya no pude ignorarla. La escondí durante días, pero sabía que no podía quedarse allí, que ése no era su lugar, así que decidí consultar a los Sabios.

Nunca antes había visto a los Sabios, había cierta leyenda alrededor de ellos, se decía que el Gran Sabio, desaparecido hace tiempo, les seguía guiando en sus cometidas, ahora sé que es cierto, y que de alguna manera estaba al lado de cada uno de nosotros. Al entrar en la tienda, me invadió una indescriptible sensación de respeto y un cierto temor, que poco a poco se fue atenuando. Les conté lo que había sucedido y les enseñé la luz. Deliberaron y poco después me hicieron llamar.



*A partir de ahí todo sucedió con gran rapidez. Tenía que salir en inmediato viaje hacia algún sitio que entonces desconocía. Me asignaron dos guías, uno espiritual, que se quedaría en el poblado, y el otro, mi gran mentora, que me acompañaría en mi camino. Parecía una persona distante, pero nunca más lejos de lo que yo conocí, lo que veía en ella era serenidad y saber estar y, sobre todo, una gran sabiduría. Fuera me esperaban siete personas más, a los que ahora llamo amigos. Cada uno tan diferente del otro como yo misma, con alguna característica propia que les hacía destacar del resto. Y todos me enseñarían algo que nunca olvidaría y que me permitiría llegar hasta el final de mi andadura.*

*Estaba la veterana, que pronto nos dejaría para ir a otro lugar, no sin antes enseñarnos todo lo que sabía. También recuerdo con gran nostalgia a la bohemia, con esa pasión por mejorar el mundo, seguramente lo mejoró con su simple presencia. Partió poco después que la veterana. A mitad de camino se nos unió el hombre misterioso, sacándonos de un lío tras otro, sobre todo a la hora de descifrar extrañas escrituras. Nunca conocí a nadie con mayor tesón. Y no puedo olvidarme de la maestra, con su particular forma de enseñar las cosas, su facilidad para escuchar a la gente y esa gran sensibilidad que la caracterizaba. Aunque nos dejó casi al final, continuó ayudándonos para que pudiésemos alcanzar nuestro objetivo. Junto con la maestra se marchó nuestra consejera espiritual, nunca olvidaré ese carisma y esa manera de sosegar nuestras almas y nuestros corazones. De los primeros sólo quedaron dos, la tierna pesimista, que con el tiempo iría cambiando su forma de ver las cosas, y que siempre nos deleitaba con una sonrisa nueva y una sabia frase. Y, por último, la gran pequeña, con un instinto de supervivencia que superaba todo lo imaginable, y que día a día reforzaría mi confianza, haciéndome ver que todo era posible. No, no me olvido de la última persona que se nos unió, por desgracia, casi no tuve tiempo de conocerla, algún día.*



*Así que allí nos encontrábamos, juntos, en medio de la nada. Con el paso de los días el cansancio se iba apoderando de nosotros, el desconocimiento y la duda iban mermando nuestras fuerzas, y nuestra visión comenzaba a tornarse borrosa. Hubo momentos de extrema debilidad. Si no fuera por toda la gente que nos ayudó, nunca lo habríamos conseguido. Nos proporcionaron víveres, medicinas, consejo, apoyo, parte de sus vidas... Toda esa gente permanecerá siempre conmigo, en mi recuerdo.*

*Un día, varios años después de nuestra partida, avistamos una roca de extraña figura, y después un gran árbol, tan primitivo que sus ramas se habían fusionando con su tronco formando una entidad única. Y pocos metros después llegamos al borde de un gran cañón, cuya profundidad no alcanzábamos a descifrar. Allí nos debíamos despedir, a partir de ahí continuaría sola. Con mucho cuidado comencé a bajar por una de las paredes del cañón, el tiempo se hizo horas y, según iba descendiendo, una densa oscuridad me cubría. Por fin, toqué suelo. Miré a mi alrededor, no conseguía ver nada. De repente, creí ver una luz al fondo, me dirigí hacia ella y ésta se fue haciendo cada vez más intensa. Es curioso, cuanto más intensa, menos quemaba. Llegué a su altura y entonces lo comprendí todo. Tras unos segundos mirándola fijamente, cara a cara, metí la mano en el bolsillo y saqué mi luz, la que años antes había encontrado en la montaña. Despacio, alcé el brazo. Mi luz palpitaba en la palma de mi mano. Ante mi atónita mirada, se desvaneció, haciendo que la insólita luz se intensificase aún más. No era la primera vez que ocurría. Esa luz había ido creciendo durante siglos y no era ni la milésima parte de lo que algún día llegaría a ser.*

*Después de todo sólo me restaba una pregunta, ¿volvería algún día a ver esa luz?*

*Pero ésa es otra historia... y el final aún está por escribir.*



## INTRODUCCIÓN

I. Tratamiento implantológico de oídos y oído	3
Clasificación de la enfermedad	4
Etiología del síndrome de la oído y oído	5
Diagnóstico del síndrome de la oído y oído	6
II. CCH	11
Localización	12
Características	13
Etiología	14
Vías de transmisión	15

## OBJETIVOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

I. Pacientes y oídos	16
Pacientes de CCH	17
Control	18

## ÍNDICE

II. Oído y oído	19
Aislamiento de oído sin cirugía (CCH)	20
Pacientes de síndrome B	21
III. Resultados	22
Análisis de resultados de oído y oído	23
Análisis de resultados de oído y oído	24
Análisis de resultados de oído y oído	25



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I. Leucemia linfoide crónica de célula B (LLC-B).....	1
Clínica de la enfermedad.....	2
Biología del linfocito B (LB) de la LLC-B.....	4
Heterogeneidad de la LLC-B.....	7
II. CD5.....	11
Localización.....	11
Estructura.....	13
Función.....	15
Vías de señalización.....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
I. Pacientes y controles.....	22
Pacientes de LLC-B.....	22
Controles.....	22
II. Obtención de células.....	23
Aislamiento de células mononucleares (CMNs).....	23
Purificación de linfocitos B.....	23
III. Inmunofenotipo.....	24
Marcaje directo de moléculas de superficie.....	24
Marcaje intracelular indirecto de ZAP-70.....	25
Marcaje intracelular directo de proteínas tirosinas quinasas fosforiladas.....	25



IV. Cultivos celulares.....	27
Entrecruzamiento de CD5 y estimulación con anti-IgM.....	27
Inhibición de la proteína quinasa C (PKC).....	28
V. Detección y cuantificación de apoptosis.....	29
Doble marcaje con anexina v/ioduro de propidio (IP).....	29
VI. Medida de proliferación.....	29
Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU).....	29
VII. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)....	30
VIII. Cuantificación proteica de IL-2 e IL-10.....	32
IX. Estudio del estado mutacional de las IgV <sub>H</sub> .....	32
X. Electroforesis e inmunodetección de proteínas ( <i>Western blot</i> ).....	34
XI. Polimorfismo del promotor del CD5.....	36
Extracción de ADN.....	36
Análisis del polimorfismo.....	36
XII. Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>9</b>
I. Estudio de la inhibición del BCR mediada por CD5.....	39
El entrecruzamiento del CD5 no rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a los LB de LLC-B.....	39
El entrecruzamiento de CD5 no incrementa el nivel de PTKs fosforiladas.....	45



II.	Efecto de la señalización iniciada a través de CD5.....	48
	La estimulación vía CD5 induce viabilidad en los LB de algunos pacientes de LLC-B.....	48
	La respuesta frente a anti-CD5 se correlaciona con la respuesta frente a anti-IgM.....	50
	Los grupos de respuesta a anti-CD5 difieren en sus marcadores de superficie.....	52
	La respuesta frente a anti-CD5 se correlaciona con la expresión de CD38 y el estado mutacional de los genes de las IgV <sub>H</sub> , pero no con la expresión de ZAP-70.....	56
	No existe correlación entre el MS del promotor del CD5 y la respuesta frente a anti-CD5.....	60
III.	Estudio de la vía de señalización del CD5.....	63
	Anti-CD5 no induce la proliferación de los LB de LLC-B.....	63
	Anti-CD5 induce la expresión génica de <i>mcl-1</i> en LB de LLC-B.....	64
	Anti-CD5 induce la expresión proteica de Mcl-1 en LB de LLC-B.....	66
	La viabilidad proporcionada por anti-CD5 está mediada por PKC.....	69
	Anti-CD5 induce la síntesis de IL-10, pero no de IL-2 en LB de LLC-B.....	71
	DISCUSIÓN.....	73
	CONCLUSIONES.....	87
	BIBLIOGRAFÍA.....	88







<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>DAG:</b> diacilglicérido
<b>ADNasa:</b> desoxirribonucleasa	<b>DE:</b> desviación estándar
<b>ADNe:</b> ADN complementario	<b>DMSO:</b> dimetil sulfóxido
<b>AET:</b> bromuro 2-aminoetilisotiuronio	<b>dNTPs:</b> deoxinucleótidos trifosfato
<b>AP-1:</b> proteína activadora 1	<b>EDTA:</b> ácido etileno diamino tetraacético
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>ELISA:</b> ensayo inmunoabsorbente asociado a enzima
<b>ARNasa:</b> ribonucleasa	<b>F-actina:</b> forma filamentosa de la actina
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>FADD:</b> dominio de muerte asociado a Fas
<b>A-SMasa:</b> esfingomielinasa ácida	<b>FBS:</b> suero bovino fetal
<b>BCR:</b> receptor de antígeno de la célula B	<b>FITC:</b> isotiocianato de fluoresceína
<b>Bis I:</b> bisindolilmaleimida I	<b>FLICE:</b> enzima tipo FADD transformadora de IL-1 $\beta$
<b>BrdU:</b> 5-bromo-2'-deoxiuridina	<b>FLIP<sub>L</sub>:</b> proteína inhibidora de FLICE
<b>BSA:</b> albúmina de suero bovino	<b>FMCS:</b> fluoruro de fenilmetanosulfonilo
<b>BCA:</b> ácido bicinconínico	<b>GM-CSF:</b> factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos
<b>CaMK IV:</b> proteína quinasa tipo IV dependiente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina	<b>gp:</b> glicoproteína
<b>(CA)<sub>n</sub>:</b> n repeticiones citosina-adenina	<b>h:</b> horas
<b>CD:</b> grupo de diferenciación	<b>Hb:</b> hemoglobina
<b>CD5L:</b> ligando del CD5	<b>IAP:</b> proteína inhibidora de apoptosis
<b>CG:</b> centro germinal	<b>IC:</b> intervalo de confianza
<b>CKII:</b> caseína quinasa II	<b>IFN:</b> interferón
<b>CM:</b> ceramida	<b>Ig:</b> inmunoglobulina
<b>CMNs:</b> células mononucleares	<b>Ig<sub>s</sub>:</b> Ig de superficie
<b>CP:</b> región rica en residuos prolina y treonina	<b>IgV<sub>H</sub>:</b> región variable de la cadena pesada de la molécula de la Ig
<b>CU:</b> cordón umbilical	
<b>CY:</b> región citoplasmática	
<b>D:</b> dominio	



**TBE:** tris bórico EDTA

**TCR:** receptor de antígeno de la célula T

**TGF:** factor de crecimiento tumoral

**TM:** dominio transmembrana

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**U:** unidades

**V:** voltios

**v.:** versión

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

**XIAP:** IAP ligada al X

**ZAP-70:** proteína asociada a la cadena zeta de 70 KDa.

**µg:** microgramo

**µl:** microlitro

**µM:** micromolar

**':** minutos

**° C:** grado centígrado

## INTRODUCCIÓN



El 15 de mayo de 1984 se celebró en Madrid el primer congreso de la Asociación de Neuropsiquiatras de España.

El congreso tuvo un carácter de reunión de trabajo. No se le dio un carácter de "congreso" en el sentido tradicional de reunir a todos los investigadores. En la práctica se dio un carácter de "reunión de trabajo" en el sentido de reunir a todos los investigadores que se ocupan de la enfermedad de Alzheimer. Este carácter se refleja en el programa y en el contenido de las sesiones. El programa se centró en la enfermedad de Alzheimer, que incluye el diagnóstico, la fisiología, la patología, la terapéutica y la epidemiología. El contenido de las sesiones se centró en la enfermedad de Alzheimer, que incluye el diagnóstico, la fisiología, la patología, la terapéutica y la epidemiología.

En conclusión, el congreso de 1984 y el de 1985 tuvieron un carácter de "reunión de trabajo" en el sentido de reunir a todos los investigadores que se ocupan de la enfermedad de Alzheimer. Este carácter se refleja en el programa y en el contenido de las sesiones. El programa se centró en la enfermedad de Alzheimer, que incluye el diagnóstico, la fisiología, la patología, la terapéutica y la epidemiología. El contenido de las sesiones se centró en la enfermedad de Alzheimer, que incluye el diagnóstico, la fisiología, la patología, la terapéutica y la epidemiología.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en la población general. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras funciones cognitivas. La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en la población general. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras funciones cognitivas. La enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en la población general. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras funciones cognitivas.



## I. LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA DE CÉLULA B (LLC-B)

La leucemia linfoide crónica de célula B (LLC-B) es la leucemia más frecuente en el mundo occidental (30% de todas las leucemias)<sup>1,2</sup>. Su incidencia es dos veces mayor en hombres que en mujeres y aumenta notablemente con la edad, siendo la media de los pacientes a diagnóstico de 65 años<sup>3</sup>. Está caracterizada por una expansión clonal de linfocitos B (LB) de fenotipo maduro, que expresan CD5 y una baja densidad de inmunoglobulina de superficie (Ig<sub>s</sub>), y que se van acumulando lenta y progresivamente en sangre, médula ósea (MO), ganglios linfáticos y bazo<sup>4,5</sup>.

Su etiología es desconocida y no se ha encontrado ninguna relación con virus u oncogenes, aunque datos epidemiológicos sugieren que determinados factores genéticos<sup>6</sup> y ambientales<sup>7</sup> pueden tener cierta implicación. No existe una alteración citogenética común a todos los pacientes, pero se han descrito diversas anomalías como deleciones en el 13q y en el 11q, trisomía del cromosoma 12 y mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*.

La mayoría de las series de LLC-B publicadas antes de 1990 incluían pacientes con otras enfermedades que ahora no se diagnosticarían como tal<sup>8</sup>. Los actuales criterios para el diagnóstico la LLC-B comprenden una linfocitosis entre 5 y 10 x 10<sup>9</sup> LB/l, la presencia de linfocitos pequeños y maduros en apariencia, y un inmunofenotipo característico (Ig<sub>s</sub>+/-, CD5+, CD23+, FMC7- y CD79β+/-)<sup>9</sup>. A causa de su positividad para el CD5, el linfoma de célula del manto (LCM) es la enfermedad que más difícilmente se distingue de la LLC-B. El LCM presenta densa expresión de Ig<sub>s</sub>,



ausencia de CD23 y positividad para FMC7, pero es la traslocación t(11;14) lo que proporciona un diagnóstico concluyente<sup>10</sup>.

El pronóstico de estos pacientes de LLC-B es muy variable. Algunos sobreviven durante un largo período y finalmente fallecen por causas no relacionadas con la enfermedad, mientras que otros cursan con un rápido desarrollo y mueren poco tiempo después del diagnóstico.

### ***Clínica de la enfermedad***

Las características clínicas de la LLC-B se deben a la acumulación de células leucémicas en MO y órganos linfoides, así como a las alteraciones inmunológicas que acompañan a la enfermedad. En MO se pueden distinguir cuatro patrones histológicos diferentes: intersticial, nodular, nodular e intersticial, y difuso; y en fases avanzadas la arquitectura nodular de los ganglios linfáticos es sustituida por una infiltración difusa de linfocitos neoplásicos<sup>11</sup>. La inmunodeficiencia es la principal característica de la LLC-B, con una acusada y progresiva hipogammaglobulinemia que eventualmente se desarrolla en todos los pacientes y una inmunidad celular alterada<sup>12</sup>.

Más del 25% de los pacientes desarrollan fenómenos autoinmunes como anemia hemolítica, trombocitopenia o, más raramente, neutropenia o aplasia de células rojas<sup>13</sup>. Paradójicamente, en la mayoría de los casos los autoanticuerpos son policlonales y no están producidos por las células tumorales, sino por el sistema inmune residual<sup>14</sup>. También se han publicado algunos casos de LLC-B asociada con lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren y tiroiditis.



Clinicamente, los pacientes con LLC-B muestran un desarrollo variado, alrededor de la tercera parte sobrevive durante 20 años o más y nunca requiere tratamiento. Sin embargo, en otros casos, la enfermedad puede progresar o ser severa desde el comienzo, requiriendo tratamiento inmediato. De aquí el interés por encontrar marcadores pronóstico que permitan adelantarse al desarrollo de esta neoplasia. Desde hace casi tres décadas se utilizan diversos sistemas de clasificación clínica que sirven para pronosticar la enfermedad, basados en las características clínicas de los pacientes. Los dos sistemas principales de este tipo de clasificación, y que actualmente continúan en vigor, fueron introducidos por Rai *et al.*<sup>15</sup> y Binet *et al.*<sup>16</sup> (Tabla 1). En realidad, ambos refieren lo mismo, cuanto más desarrollada está la enfermedad, peor pronóstico. Además, han sido reconocidos otros indicadores pronóstico clínicos, como el tiempo de duplicación linfocitaria<sup>17</sup> o la histología de la médula ósea<sup>18</sup>. Actualmente también se emplean marcadores biológicos adicionales, como son el estado mutacional de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgV<sub>H</sub>), la expresión de CD38 y ZAP-70 o el estado funcional del gen supresor de tumores p53<sup>19</sup>; aunque se siguen buscando nuevos marcadores que definan mejor el futuro desarrollo de la enfermedad.

Tabla 1.- Sistemas de clasificación de Rai y Binet para la LLC-B.

Sistema	Estadio	Características clínicas	Supervivencia a los 5 años
Rai	0	Linfocitosis sólo en sangre y MO	Aprox. 98%
	I	Linfocitosis + linfadenopatía	Aprox. 95%
	II	Linfocitosis + esplenomegalia y/o hepatomegalia ± linfadenopatía	Aprox. 88%
	III	Linfocitosis + anemia (Hb < 11 g/dl)	< 5%
	IV	Linfocitosis + trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /dl)	0%
Binet	A	Menos de tres áreas linfoides implicadas*	Aprox. 90%
	B	Tres o más áreas linfoides implicadas	Aprox. 63%
	C	Anemia (Hb < 10 g/dl) y/o trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /dl)	Aprox. 40%

Se muestran los estadios en los que se divide cada clasificación, las características clínicas de cada uno de los estadios y el porcentaje de pacientes que sobreviven a los 5 años.

Un sistema de Rai modificado identifica tres grupos de riesgo (0-I: bajo; II-III: intermedio; IV: alto)

\*Cervical, axilar, inguinal (unilateral o bilateral), bazo e hígado, cada uno cuenta como un área



Aunque los tratamientos que existen hoy en día no son totalmente eficaces, se están realizando grandes esfuerzos para mejorar la calidad de vida de los pacientes con LLC-B. Los tratamientos convencionales comprenden agentes alquilantes, como clorambucil y ciclofosfamida; y análogos de purina, como fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina<sup>20</sup>. Otros tratamientos incluyen anticuerpos anti-CD20 (rituximab) y anti-CD52 (alemtuzumab). El trasplante alogénico se puede practicar en pacientes jóvenes que se encuentran en estadios tempranos, antes de que desarrollen resistencia a la quimioterapia<sup>9</sup>. Pero, sin duda, la terapia génica es una de las líneas más prometedoras que se están investigando hoy en día<sup>21</sup>.

### ***Biología del LB de LLC-B***

La LLC-B está caracterizada por una persistente linfocitosis en sangre y MO. Los linfocitos leucémicos son pequeños y monomórficos, aunque hay un pequeño porcentaje de células más grandes y con un prominente nucleolo (prolinfocitos). Tanto en MO como en ganglios linfáticos los linfocitos son idénticos a los sanguíneos, y se distinguen zonas proliferantes con linfocitos más grandes denominadas centros de proliferación o pseudofolículos<sup>22</sup>.

El inmunofenotipo de la célula B de LLC-B fue rápidamente definido después de la descripción de la enfermedad. Su característica distintiva es la coexpresión de CD5 con cantidades casi indetectables de inmunoglobulina de superficie<sup>23</sup>. Estas Ig<sub>s</sub> son normalmente IgM y/o IgD, y muy raramente IgG o IgA<sup>24,25</sup>. Además, el LB neoplásico expresa CD22, CD23, cantidades disminuidas de CD79b (Ig $\beta$ ) y, algunos pacientes, baja cantidad de CD20<sup>26</sup>. Sin embargo, no es inusual encontrar casos de LLC-B con



células que son atípicas en el fenotipo, aunque no está bien definido si estos casos son excepciones o si la LLC-B cubre un espectro que incluye diferentes formas todavía sin identificar plenamente.

En la actualidad, el conocimiento molecular de la LLC-B es incompleto. En el 80% de los casos se observa un cariotipo anormal. Las alteraciones más frecuentes son deleciones o traslocaciones del 13q14, asociadas con un desarrollo benigno de la enfermedad, linfocitosis progresiva lenta, estable y aislada; la trisomía del 12, con enfermedad progresiva, morfología celular atípica y escasa supervivencia; y deleciones del 11q23 y del 6q, que comprenden un desarrollo variable de la enfermedad. También se han encontrado alteraciones en el gen supresor de tumores *p53* en el 15% de los pacientes, lo que se asocia con una morfología celular atípica, avanzada enfermedad, alto grado de proliferación y corta supervivencia.

La mayoría de las células circulantes de esta enfermedad se encuentran detenidas en la fase  $G_0$  del ciclo celular. Debido a la baja tasa de células proliferantes se piensa que la acumulación de los LB tumorales es consecuencia de un fallo en la apoptosis, un mecanismo de muerte celular programada fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune<sup>27</sup>. Pero a pesar de la prolongada viabilidad que presentan las células B tumorales *in vivo*, éstas mueren rápidamente por apoptosis espontánea cuando se cultivan *in vitro*<sup>28</sup>, lo cual indica que hay un conjunto de factores necesarios para el mantenimiento de la viabilidad *in vivo*.

Uno de los factores causantes de esta falta de apoptosis es la elevada expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, encontrada en el 80% de los casos. Los



mecanismos responsables permanecen sin esclarecerse, aunque parece que se debe a la hipometilación del promotor del gen de *bcl-2*, dado que la traslocación t(14;18) es muy rara en LLC-B<sup>29</sup>. Bcl-2 pertenece a una familia de proteínas que juegan un importante papel en la regulación de la apoptosis<sup>30</sup>. Las proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y Mcl-1, previenen de la apoptosis en respuesta a una amplia variedad de estímulos; por el contrario, los productos de genes pro-apoptóticos pertenecientes a la misma familia, Bad, Bax y Bcl-x<sub>S</sub>, pueden acelerar la muerte y en algunos casos son suficientes para producir apoptosis<sup>31,32</sup>. En LLC-B, además de la alta expresión de Bcl-2, se ha observado una elevada expresión de Mcl-1 y una disminuida cantidad de Bcl-x<sub>L</sub><sup>33,32</sup>. Otra importante familia en el control de la apoptosis es la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Se ha encontrado que en LB circulantes de LLC-B se expresan constitutivamente NAIP, cIAP1, cIAP2 y XIAP, mientras que en los pseudofolículos de los ganglios linfáticos y la MO hay expresión de survivina, pudiendo también inducirse *in vitro* al estimular vía CD40<sup>34</sup>. Además de estas dos familias de proteínas, hay datos sobre el importante papel que juegan otras proteínas anti-apoptóticas, como la proteína inhibidora de FLICE (FLIP<sub>L</sub>), en estas células tumorales<sup>5,35</sup>.

Junto con estos factores, hay toda una serie de mecanismos relacionados con la apoptosis que no funcionan adecuadamente en las células B de LLC-B y que pueden favorecer la prolongada supervivencia de estos linfocitos tumorales<sup>36</sup>.

Diversas líneas apoyan que las células no tumorales y otros elementos extrínsecos a las células de LLC-B proporcionan señales de viabilidad, indicando la importancia del microambiente en el mantenimiento de estas células neoplásicas<sup>37,38</sup>. Se



han publicado diferentes estudios en los que se observa un aumento de la viabilidad en células de LLC-B cuando están en contacto con otras células no tumorales<sup>39-41</sup>. Además del contacto, diversos factores solubles también juegan un papel importante en supervivencia, diferenciación y apoptosis de linfocitos B normales y tumorales, induciendo un amplio rango de respuestas<sup>42</sup>. Los LB neoplásicos se ven influidos *in vitro* por un número de factores añadidos exógenamente que incluyen interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-10, IL-13, IL-15, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y TNF- $\beta$ , interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  y factor 1 derivado de célula estromal (SDF-1)<sup>42-44</sup>, y que pueden contribuir al retraso de apoptosis de estas células. Además, la célula B de LLC-B puede producir distintas citocinas en respuesta a diversos estímulos, las cuales podrían tener un efecto autocrino: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF, factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) y factor de crecimiento tumoral- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)<sup>45</sup>.

### ***Heterogeneidad de la LLC-B***

Es ahora bien conocido que la LLC-B es una enfermedad muy heterogénea, no sólo a nivel clínico sino también celular y molecular<sup>46</sup>. La naturaleza del linfocito, su origen, ontogenia y función continúan siendo un enigma.

Aunque los sistemas de Rai y Binet son métodos útiles para valorar el pronóstico del paciente, no proporcionan el conocimiento de las bases de la heterogeneidad. En 1994 Schroeder y Dighiero demostraron la existencia de dos grupos de LLC-B a nivel molecular, ya que aproximadamente el 50% de los pacientes presentaban mutaciones somáticas en los genes de la IgV<sub>H</sub><sup>47</sup>. Poco después, dos líneas de investigación



independientes revelaron que la presencia o ausencia de tales mutaciones predecían el desarrollo clínico de la enfermedad<sup>48,49</sup>. Los pacientes cuyas células B presentaban genes IgV<sub>H</sub> mutados cursaban con una progresión más favorable (supervivencia > 24 años) que aquéllos que no expresaban mutaciones (supervivencia de 6 a 8 años). Aunque el completo conocimiento de la relación entre las mutaciones y el desarrollo clínico permanece sin ser descubierto, se ha especulado que podría relacionarse con las diferentes anomalías cromosómicas que se asocian con cada uno de los subgrupos. Las células leucémicas que presentan IgV<sub>H</sub> no mutados muestran más frecuentemente alteraciones citogenéticas asociadas con mal pronóstico (deleciones en el 11q22-23, deleciones del 17p, trisomía del 12 o disfunciones en *p53*), mientras que las células de pacientes con mutaciones en las IgV<sub>H</sub> presentan alteraciones cromosómicas asociadas con un curso clínico benigno (delección del 13q14). Otra hipótesis es que, puesto que las mutaciones en las IgV<sub>H</sub> están relacionadas con el proceso de hipermutación somática, es decir, la maduración de la afinidad en respuesta a antígeno, sea indicativo del tipo de respuesta que ha originado la expansión de estas células tumorales<sup>50</sup>.

Debido a la importancia que supone conocer el estado de las IgV<sub>H</sub>, se intentó relacionar con rasgos fenotípicos fáciles de analizar, dado el coste, el tiempo y la poca accesibilidad que conlleva el análisis de las mutaciones. Damle *et al.*<sup>48</sup> observaron una fuerte correlación entre la expresión de CD38 (marcador de activación y maduración) y la presencia de genes IgV<sub>H</sub> no mutados, sugiriendo que el fenotipo de superficie podría utilizarse para identificar pacientes con pronóstico desfavorable. Pero pronto aparecieron trabajos en los cuales esta correlación no se confirmaba, ya que describían cambios en la expresión de CD38 durante el curso de la enfermedad<sup>51</sup>, pudiendo estar



relacionados con un desarrollo hacia un estadio más agresivo<sup>52</sup>. Varios grupos continúan discutiendo acerca de la utilidad del CD38 como indicador pronóstico<sup>53,54, 55-62</sup>.

Con el desarrollo de técnicas adecuadas para comparar el perfil de expresión génica, otra molécula importante en señalización, ZAP-70, se encontró asociada al grupo de las IgV<sub>H</sub> no mutadas y a un pronóstico desfavorable<sup>63,64</sup>. ZAP-70 es una proteína tirosina quinasa (PTK) asociada al receptor de antígeno la célula T (TCR) y es crítica para la activación por antígeno de estas células. La importancia de esta molécula radica en que un grupo de investigadores, Crespo *et al.*<sup>65</sup>, ha conseguido desarrollar un método sencillo y accesible basado en citometría de flujo para analizar la presencia o ausencia de ZAP-70 en los LB. Se trataría de una herramienta muy útil si se confirma que la correlación con el estado de las IgV<sub>H</sub> es buena, por ello es necesario seguir realizando estudios en esa dirección.

Hace años se pensaba que los LB de LLC-B que habían sufrido mutaciones en las IgV<sub>H</sub> derivaban de una célula de memoria, mientras que las células con IgV<sub>H</sub> no mutadas derivaban de una célula virgen<sup>49</sup>. Pero el progreso en el conocimiento molecular y el hecho de que las células tumorales presenten un fenotipo y otra serie de características propias de LB de memoria, independientemente del estado de las IgV<sub>H</sub><sup>66,67</sup>, ha llevado a la postulación de una nueva teoría sobre el origen de estas células neoplásicas. Según ésta, ambos grupos celulares derivarían de LB activados por antígenos inmunológicamente competentes, y se diferenciarían por el tipo de estímulo antigénico recibido: estimulación T-dependiente en centro germinal (CG), en el caso de las mutadas, y T-dependiente fuera de CG o T-independiente, en el de las no mutadas<sup>66,68</sup>. Actualmente, sigue siendo un enigma la naturaleza del antígeno que ha



originado la expansión del clon de LB en la LLC-B y el fallo de los mecanismos reguladores de apoptosis que han permitido dicha expansión.

Por esta razón, está cobrando gran importancia el análisis del comportamiento de ambos grupos de LLC-B frente a estímulos específicos del receptor de la célula B (BCR). Zupo *et al.*<sup>69,70</sup> estudiaron la respuesta según la expresión de CD38, observando que los LB CD38<sup>+</sup> sufrían apoptosis inducida por la señalización vía BCR, cosa que no ocurría con las células B CD38<sup>-</sup>. Poco después, Lanham *et al.*<sup>71</sup> presentaron evidencias de que las células que tenían IgV<sub>H</sub> no mutadas sufrían una mayor fosforilación de PTKs después de la unión de antígeno al BCR, indicativo de la transducción de señales. Estas observaciones concuerdan con las hechas por Chen *et al.*<sup>63</sup> y sugieren que los dos subtipos difieren en su capacidad para responder al entrecruzamiento de su Ig<sub>α</sub> por antígeno. En este trabajo Chen apuntó que la señalización vía BCR estaba más estrechamente relacionada con la expresión de ZAP-70, incluso en casos especiales en los que se expresaba en LB con IgV<sub>H</sub> mutadas.

La diferencia en la capacidad de las células leucémicas para ser estimuladas por el receptor de antígeno se relaciona con diferencias en el comportamiento clínico. Si es así, los análisis de la señalización vía BCR podrían proporcionar un indicador pronóstico más fiable que el CD38, el estado mutacional y otras características que diferencian ambos grupos.

Pero la respuesta celular vía BCR también depende de señales adicionales de glicoproteínas asociadas al receptor de antígeno, las cuales sufren fosforilación en tirosinas después de la agregación del mismo. Entre éstas se encuentra el CD5, que



modula las señales de activación y diferenciación mediadas por el BCR<sup>72</sup>. Las bases moleculares de esta inmunomodulación permanecen sin definirse. Además, la expresión de esta molécula es característica de los LB de LLC-B, lo que denota que podría tener una importante función en el desarrollo de esta enfermedad.

## II. CD5

El CD5 es una glicoproteína monomérica de tipo I de 67 KDa perteneciente a la familia de receptores *scavenger* ricos en cisteína (SRCR)<sup>73</sup> y que se expresa en la superficie celular. Es una molécula muy conservada a lo largo de la evolución y, por ello, se piensa que juega un papel semejante en diversas especies, tanto en el desarrollo de los linfocitos como en su función.

### Localización

El CD5 fue identificado primero en células T de ratón (Lyt-1 o Ly-1)<sup>74</sup> por tinción con un anticuerpo monoclonal. De la misma forma, poco después este descubrimiento se trasladó a linfocitos humanos, donde se halló un antígeno (Leu 1) en células T timo-dependientes y en células de LLC-B<sup>75</sup>. Más tarde se identificó en linfocitos T (LT) maduros y en células B normales de adultos<sup>76</sup>.

Las células B humanas abarcan al menos tres poblaciones diferentes según la expresión de CD5, denominadas B-1a, B-1b y B-2. Las células B-1a, que representan la población mayoritaria de LB en la vida temprana, presentan constitutivamente esta molécula. Los B-1b son funcionalmente similares a los B-1a y presentan ARNm para



CD5, aunque pierden su expresión en superficie; lo mismo ocurre con los linfocitos B convencionales (B-2). Sin embargo, se puede inducir la expresión de esta molécula en las poblaciones CD5<sup>+</sup> utilizando mitógenos policlonales<sup>77,78</sup>. Si las células B-1 son el resultado de un linaje celular distinto al de las B-2, o bien, aparecen como resultado de una activación (por una vía concreta, como el entrecruzamiento del receptor para antígeno), todavía no se ha esclarecido totalmente.

Los linfocitos B CD5<sup>+</sup> existen en diversas especies, pero su proporción y localización anatómica es muy variable. En humanos, las primeras células B en aparecer en el hígado fetal y en los nódulos linfáticos en desarrollo son virtualmente 100% CD5<sup>+</sup><sup>79</sup>, y su frecuencia va disminuyendo con la edad fetal. En cordón umbilical (CU) el porcentaje es bastante menor, pasando a representar de un 60 a un 80%<sup>80</sup>. Por el contrario, en individuos adultos sólo un pequeño porcentaje de linfocitos B expresan CD5 de forma constitutiva (5-30%), y se localizan preferentemente en las cavidades pleural y peritoneal. Representan menos del 10% en el bazo y de un 30% en nódulos linfáticos y amígdalas, donde se concentran alrededor de los centros germinales, principalmente en la zona del manto folicular. Por el contrario, están virtualmente ausentes en MO de individuos adultos, aunque hay un alto nivel de ARNm de CD5 en progenitores de células B.<sup>81</sup>

Si los linfocitos B de LLC-B provienen de células B-1a o de B-2 permanece siendo una incógnita. Las primeras que se identificaron como homólogas fueron las B-1a<sup>82</sup>, aunque poco después aparecieron otras teorías sugiriendo que podrían provenir de la zona del manto folicular<sup>83</sup>. Actualmente, basándose en el fenotipo y en el perfil de



expresión génica, la idea de que provienen de células de la zona marginal extrafolicular parece la más aceptada<sup>50</sup>.

### ***Estructura***

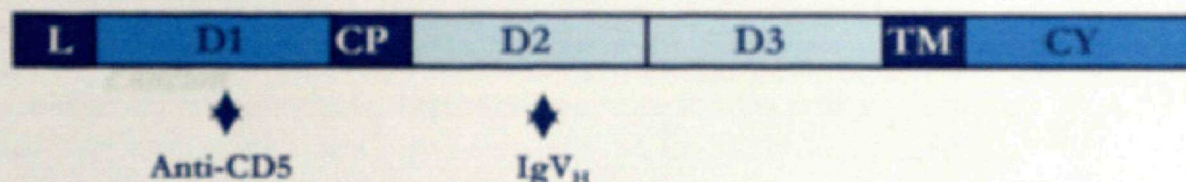
El gen que codifica para el receptor de superficie humano CD5 fue el primero localizado en la región 13q del cromosoma 11<sup>84</sup>, y recientemente se ha localizado de forma más precisa en la región 11q12.2, a 85 Kb teloméricas del gen para CD6<sup>85</sup>. Esta región se encuentra muy próxima a otra comúnmente afectada por múltiples mutaciones somáticas en diversos cánceres humanos. Recientemente, el análisis de la secuencia del promotor del CD5 humano ha revelado la existencia de un polimorfismo, un microsatélite (MS) (CA)<sub>n</sub> conservado a lo largo de la evolución<sup>86,87</sup>. Este MS está localizado a 607 pares de bases (pb) de la metionina de iniciación y puede representar un marcador útil para estudiar la inestabilidad genética de esta región<sup>88</sup>. A pesar del interés en el conocimiento del papel funcional de la molécula de CD5 humana en la activación y diferenciación de los linfocitos, los mecanismos moleculares involucrados en el control de la expresión del gen del CD5 continúan sin ser analizados. Estos aspectos son de particular importancia para la comprensión de su especificidad linfoide, así como de su papel biológico, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Estructuralmente, la molécula de CD5 está compuesta por tres dominios SRCR denominados D1, D2 y D3 y que se encuentran localizados en la región extracelular<sup>89</sup> (Figura 1). Separando los dos primeros dominios hay una región bisagra rica en residuos de prolina y treonina (CP). El dominio transmembrana (TM) va seguido de una larga



región citoplasmática (CY) que contiene algunos motivos conservados potencialmente involucrados en transducción de señales<sup>90</sup>.

A través del dominio D2<sup>91</sup>



Diversos datos bioquímicos sugieren que...

**Figura 1.** (Adaptado de Calvo *et al.* 1999) Representación esquemática de la estructura proteica de la molécula de CD5. L, péptido líder. CP, región bisagra. D1, dominio 1. D2, dominio 2. D3, dominio 3. TM, región transmembrana. CY, región citoplasmática. Las moléculas específicas para CD5 se unen mediante el dominio D1 y las regiones IgV<sub>H</sub> a través del dominio D2.

Regulación de la estimulación iniciada a través de antígenos

Se han encontrado al menos cuatro ligandos naturales para el CD5. El primer ligando identificado fue el CD72, que se expresa principalmente sobre células B y esplenocitos<sup>91</sup>. Por el hecho de que el CD5 se exprese en la mayoría de los LT, se pensaba que su unión a CD72 era necesaria para la coestimulación de los LB. Actualmente esta idea está descartada, parece que este ligando regula el desarrollo de las células B en diferentes estadios<sup>92</sup>. Otro de los ligandos es una glicoproteína (gp35-37) expresada durante la activación de esplenocitos, células B y clones Th1 y Th2<sup>93</sup>. Se piensa que la unión del CD5 a este ligando sobre LT puede tener un papel importante en la coestimulación célula B-célula T durante la respuesta inmune T-dependiente. Además de estos dos ligandos, se ha observado que secuencias codificantes de la IgV<sub>H</sub> también pueden unirse a CD5. Pospisil *et al.* lo describieron en LB de conejos<sup>94</sup> y, más tarde, lo confirmaron en LB humanos<sup>95</sup>. Más recientemente, Calvo *et al.*<sup>96</sup> han encontrado un ligando para el CD5 (CD5L), ampliamente expresado en la superficie celular de linfocitos y monocitos de sangre periférica y en diversas líneas celulares de origen



epitelial, mielomonocítica y linfoide (T y B). Se ha observado que anticuerpos anti-CD5 reconocen tan sólo epítomos pertenecientes al dominio D1<sup>97</sup> y que la unión con las V<sub>H</sub> es a través del dominio D2<sup>94</sup>.

### ***Función***

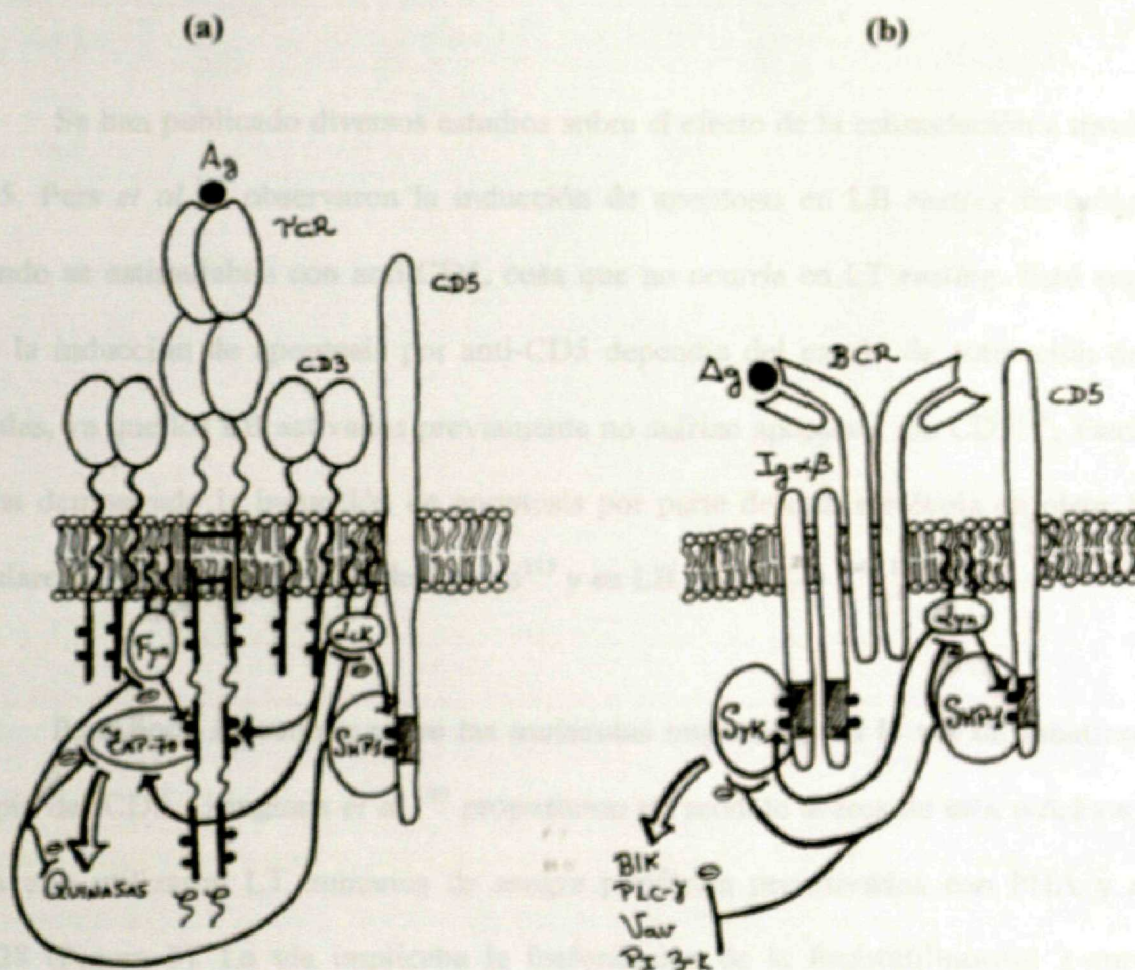
Diversos datos bioquímicos establecen que la molécula de CD5 está físicamente asociada al complejo receptor de antígeno presente en células T (TCR/CD3), más concretamente a CD3 $\zeta$ , y al presente en células B (BCR)<sup>98-100</sup>, jugando un papel en la regulación de la señalización iniciada a través de ambos.

Los primeros estudios sobre el papel del CD5 indicaban que funcionaba como molécula coestimuladora de LT tanto murinos como humanos<sup>101-103,104</sup>. Posteriores trabajos con ratones *knockout* para el CD5 sugerían que este receptor podía regular negativamente la señalización mediada por el receptor de antígeno tanto en timocitos como en células B-1<sup>105,106</sup>. Además, Bikah *et al.*<sup>106</sup> observaron en células B-1 de ratón que la ausencia de CD5 rescataba de la apoptosis producida por anti-IgM, mientras que aumentaba la proliferación en linfocitos B-2 estimulados de igual manera.

Los datos bioquímicos obtenidos recientemente demuestran que el CD5 regula la señal iniciada a través del BCR mediante el reclutamiento de SHP-1 (fosfatasa-1 con dominio SH2), y su posterior acercamiento al receptor de antígeno, impidiendo así la señalización iniciada por esta vía<sup>107,108</sup>. Todo indica que la SHP-1 se encuentra físicamente asociada tanto al CD5 como al receptor de antígeno. Cuando éste reconoce antígeno, se dispara su vía de señalización y el CD5 se fosforila (parece que por medio



de la PTK Lck en  $LT^{109}$  y de Lyn en  $LB^{110}$ ). A su vez, el CD5 fosforila a la SHP-1, la cual desfosforila a las proteínas tirosinas quinasas iniciales de la cascada de señalización disparada por el antígeno (Figura 2). Se piensa que es una forma de impedir la expansión incontrolada de las células  $CD5^+$ .



**Figura 2.-** Modulación por CD5 de la respuesta iniciada por el receptor de antígeno. (a) Cuando el TCR ve antígeno (Ag), se fosforilan Lck y Fyn, dos PTKs. Éstas fosforilan tirosinas de la cadena  $\zeta$  del TCR, lo cual atrae a otra PTK, ZAP-70. Una vez inmobilizada, Lck fosforila a ZAP-70, molécula encargada de iniciar la cascada de señalización mediante la activación de otras PTKs. A la vez que se activa el TCR, Lck fosforila a CD5, el cual activa a SHP-1. Ésta se acerca al TCR y desfosforila a las PTKs iniciales de la cascada, Lck, Fyn y ZAP-70. (b) Cuando el BCR ve Ag, se fosforila una PTK, Lyn, que a su vez fosforila al heterodímero  $I\gamma\alpha\beta$  que se encuentra acoplado al BCR. Esto hace que Syk se acerque, se fosforile y a su vez active a otra serie de PTKs (Blk, BLNK, PLC- $\gamma$ , Vav, PI3-K), que se encargarán de continuar la señalización iniciada por Lyn. A su vez, Lyn fosforila a CD5, el cual activa a SHP-1. Ésta desfosforila a todas las PTKs fosforiladas inicialmente, inhibiendo así la señalización vía BCR.



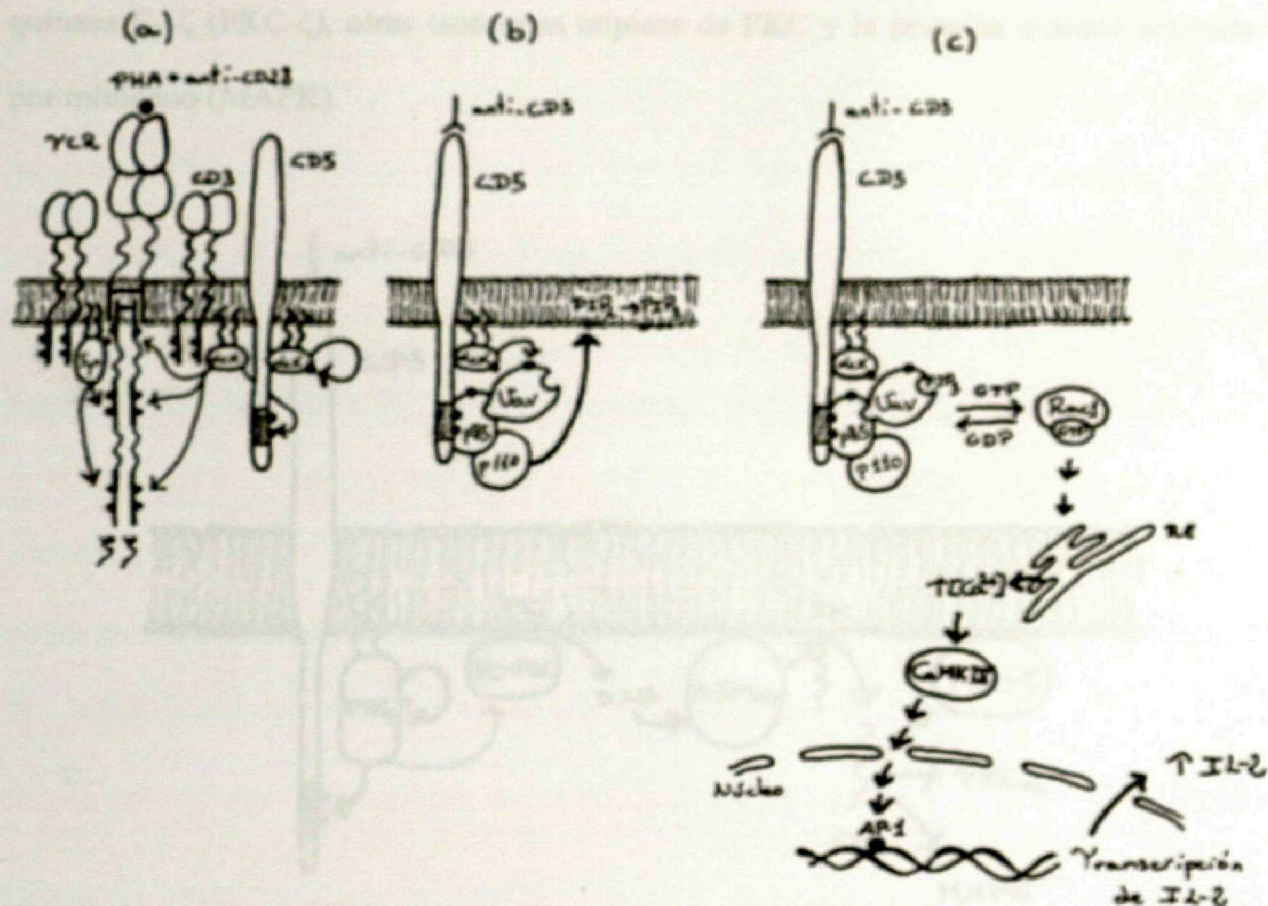
Además de este efecto modulador sobre el antígeno receptor, el CD5 posee una vía de señalización propia que es independiente de TCR y BCR<sup>109,111,112</sup>. Cuál es el significado biológico todavía está por descubrir.

### ***Vías de señalización***

Se han publicado diversos estudios sobre el efecto de la estimulación a través de CD5. Pers *et al.*<sup>113</sup> observaron la inducción de apoptosis en LB *resting* de amígdala cuando se estimulaban con anti-CD5, cosa que no ocurría en LT *resting*. Esto sugería que la inducción de apoptosis por anti-CD5 dependía del estado de activación de las células, ya que los LB activados previamente no sufrían apoptosis vía CD5<sup>114</sup>. También se ha demostrado la inducción de apoptosis por parte de esta molécula en otros tipos celulares, como en LB de ganado bovino<sup>115</sup> y en LB de LLC-B<sup>116,117</sup>.

Pero poco se conoce sobre las moléculas implicadas en la vía de señalización propia del CD5. Gringhuis *et al.*<sup>109</sup> propusieron un modelo acerca de esta señalización, para ello utilizaron LT humanos de sangre periférica preactivados con PHA y anti-CD28 (Figura 3). La vía implicaba la fosforilación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) mediante coestimulación con anti-CD5 y la activación de la proteína quinasa tipo IV dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMK IV). Además, observaron que los efectos de PI3-K no eran mediados por la proteína quinasa B (PKB) ni por la quinasa p70 S6. Otro dato importante fue el hecho de que se estimulaba la producción de IL-2 a través de CD5.



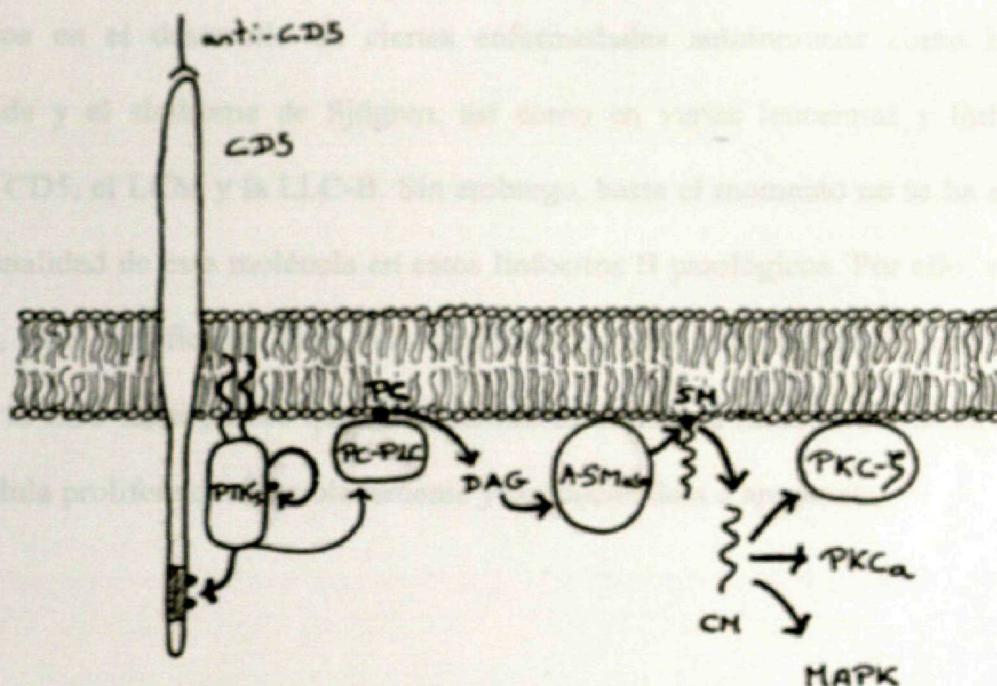


**Figura 3.-** (Adaptado de Gringhuis *et al.* 1998) Vía de señalización del CD5 en LT humanos de sangre periférica. (a) Después de la estimulación del TCR, CD5 es fosforilado por Lck, ésta se asocia con CD5 y se activa completamente por autofosforilación. (b) La subunidad p85 de la PI3-K se une a los residuos fosforilados de CD5 y Vav se une a la subunidad p85. Mediante la coestimulación con anti-CD5, PI3-K es fosforilada, probablemente por Lck, y se activa la subunidad p110, la cual transforma el fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP<sub>2</sub>) en fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Vav es también preactivada por Lck. (c) Cuando PIP<sub>3</sub> u otros productos lipídicos se unen a Vav, ésta se activa completamente y activa a Rac1 mediante el cambio de GDP a GTP. Esta ruta provoca la liberación del Ca<sup>2+</sup> intracelular localizado en zonas como el retículo endoplásmico (RE). El aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> provoca la activación directa de la CaMK IV, lo que está asociado con un incremento de la actividad AP-1 en el promotor de la IL-2, resultando en un aumento de la transcripción y expresión del gen de la IL-2.

El grupo de Simarro<sup>112</sup> estudió esta vía en células Jurkat, una línea derivada de linfoma de célula T (Figura 4). Al estimular los LT con anti-CD5 observaron que había un aumento en la fosforilación de PTKs, lo que provocaba la activación de la fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina (PC-PLC). Por medio de ésta, y por una ruta que implica diacilglicérido (DAG) y ceramida (CM), se activaban la proteína



quinasa C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ), otras isoformas atípicas de PKC y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).



**Figura 4.-** Vía de señalización del CD5 en células de Jurkat, según Simarro *et al.* Al estimular los LT con anti-CD5 hay un aumento de la fosforilación de PTKs, lo que provoca la activación de la fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina (PC-PLC). Por medio de ésta se transforma la fosfatidilcolina (PC) y se produce el aumento de segundos mensajeros, en este caso de diacilglicérido (DAG). El DAG activa a la esfingomielinasa ácida (A-SMase), que hidroliza la esfingomielina (SM), produciéndose ceramida (CM), otro segundo mensajero. Este último activaría varias proteínas, como la PKC- $\zeta$ , otras isoformas atípicas de PKC (PKC $\alpha$ ) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).

Hay otra serie de estudios en células de líneas de linfoma B de ratón y en Jurkat que implican a diferentes moléculas en esta ruta, como la caseína quinasa II (CKII)<sup>111</sup>, compuesto que se sabe que se une a PC-PLC y que parece que tiene una modulación positiva o negativa sobre el receptor de antígeno dependiendo del sustrato sobre el que actúe. En LB de LLC-B se ha observado que la estimulación vía CD5 produce un aumento en la fosforilación de Lck<sup>118</sup>, proteína específica de célula T y que está implicada en supervivencia.



La importancia de la subpoblación de linfocitos B CD5<sup>+</sup> en la respuesta inmune es clara, como indica su expansión en ciertas patologías infecciosas (entre ellas la hepatitis C<sup>119</sup> y la infección por VIH<sup>120</sup>). Los linfocitos B CD5<sup>+</sup> también están implicados en el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, así como en varias leucemias y linfomas de fenotipo CD5, el LCM y la LLC-B. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la funcionalidad de esta molécula en estos linfocitos B patológicos. Por ello, surge una pregunta, qué significado tiene esta molécula en una enfermedad linfoproliferativa como es la LLC-B, si parece que su cometido es inhibir la función del BCR, evitando que la célula prolifere descontroladamente y conduciéndola a apoptosis.



La LLC-B es una enfermedad linfoproliferativa aguda por la cual la célula B, en la expresión en superficie del CD5, que caracteriza por parte de los linfocitos B normales, hace la unión de antígeno al BCR y que, además, tiene la propiedad de autorreconocimiento.

El propósito de este estudio es analizar el papel del CD5 en las LB de LLC-B y su posible contribución en la prolongada supervivencia de estas células. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la regulación de la respuesta vía BCR por parte de la molécula de CD5 en LB de LLC-B.
- 2.- Definir la vía de señalización propia del CD5 y su efecto en la viabilidad de las células B de LLC-B.
- 3.- Determinar qué genes pro o anti-apoptóticos pueden estar involucrados en esta señalización.
- 4.- Analizar si la respuesta frente a CD5 se relaciona con algún factor particular como el estado mutacional de las IgV, la expresión de BCL2 o la presencia de ZAP-70.

## OBJETIVOS



La LLC-B es una enfermedad linfoproliferativa cuya principal característica es la expresión en superficie de CD5, una molécula que parece inhibir las señales iniciadas tras la unión de antígeno al BCR y que, además, tiene su propia vía de señalización.

El propósito de este estudio es analizar el papel del CD5 en los LB de LLC-B y su posible contribución en la prolongada supervivencia de estas células. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la regulación de la respuesta vía BCR por parte de la molécula de CD5 en LB de LLC-B.
- 2.- Definir la vía de señalización propia del CD5 y su efecto en la viabilidad de las células B de LLC-B.
- 3.- Determinar qué genes pro o anti-apoptóticos podrían estar involucrados en esta señalización.
- 4.- Analizar si la respuesta frente a CD5 se relaciona con algún factor pronóstico, como el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>, la expresión de CD38 o la presencia de ZAP-70.



## PACIENTES Y CONTROLES

### Pacientes de HCC-B

Se seleccionaron 139 muestras de sangre periférica procedentes de 146 pacientes diagnosticados de HCC-B según criterios clínicos, bioquímicos e instrumentales<sup>1,2,4</sup> que no habían recibido tratamiento durante el tiempo que precedió al inicio del estudio. Las muestras procedían de los Hospitales Universitarios (U de Valencia, J. A. Irazo, Clinica San Carlos y Puerta de Hierro de Madrid). La edad media de los pacientes era de 70 años, con un rango comprendido entre los 43 y los 86 años. La mayoría eran varones (61%) de mujeres. Seve al 33% de hombres. La infección crónica por el virus del hepatitis B era de 23 600 infecciones/ml<sup>5</sup>.

### Controles

Se estudiaron 33 muestras de sangre periférica de 33 voluntarios sanos de la célula del mismo

## MATERIALES Y MÉTODOS

Puerta de Hierro, 28 muestras de suero de donantes de la misma célula que las muestras reactivas recibidas por el servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Puerta de Hierro; 30 muestras de suero de donantes de la misma célula procedentes del Centro de Transfusiones de la Universidad de Madrid; y 33 muestras de suero periférico de donantes saludables procedentes de la empresa Sociedad Española de Promoción y Ediciones.



## **I. PACIENTES Y CONTROLES**

### ***Pacientes de LLC-B***

Se utilizaron 159 muestras de sangre periférica procedentes de 146 pacientes diagnosticados de LLC-B según criterios clínicos, fenotípicos e inmunológicos<sup>4,121</sup> y que no habían recibido tratamiento durante al menos los últimos seis meses previos al estudio. Las muestras procedían de los Hospitales Universitarios 12 de Octubre, La Paz, Clínico San Carlos y Puerta de Hierro de Madrid. La edad media de los pacientes era de 70 años, con un rango comprendido entre los 45 y los 86 años. Entre ellos había un 41% de mujeres, frente al 59% de hombres. La linfocitosis media en el momento del estudio era de 23.600 linfocitos/mm<sup>3</sup>.

### ***Controles***

Se emplearon 52 muestras de sangre periférica de 48 enfermos de linfoma de célula del manto procedentes de los Hospitales Universitarios Clínico San Carlos y Puerta de Hierro; 28 muestras de amígdalas de individuos adultos con procesos reactivos cedidas por el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro; 30 muestras de sangre de cordón umbilical proporcionados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid; y 53 muestras de sangre periférica de donantes sanos adultos pertenecientes a la empresa Sociedad Anónima de Promoción y Ediciones.



## II. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

### *Aislamiento de células mononucleares (CMNs)*

Las muestras de sangre periférica de pacientes y donantes sanos se diluyeron al 50% con tampón fosfato salino (PBS) (Amresco, Solon, Ohio); en el caso de la sangre de cordón umbilical se utilizó PBS/0,6% citrato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para evitar agregaciones celulares. Las amígdalas se disgregaron mecánicamente y se pasaron por un filtro de 70  $\mu$ m (Falcon, B.D Labware Europe, Le Pont De Claix, Francia). Posteriormente, se aislaron las células mononucleares de cada una de las muestras por centrifugación en gradiente de densidad (Comercial Rafer S.L., Zaragoza, España)<sup>122</sup>.

En todos los casos se contabilizó el número de células por microscopía directa (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), mediante la exclusión del colorante vital azul tripán (Sigma-Aldrich).

### *Purificación de linfocitos B*

La purificación de linfocitos B se realizó mediante métodos de selección negativa, como se detalla a continuación:

- Los LB de pacientes de LLC-B y LCM se aislaron utilizando microesferas magnéticas (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) cubiertas con



anticuerpos anti-CD2 y anti-CD14. En el caso del CU, se utilizó un *kit* de selección negativa para el aislamiento de LB, que contenía los anticuerpos anti-CD14, anti-CD2, anti-CD3 (Dynabeads®, Dynal A.S, Oslo, Noruega), además, se le añadió un anti-CD11b (clon D12) (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA) para eliminar células adherentes.

- Los LB de amígdala se aislaron por roseteo con hematíes de carnero (Oxoid S.A., Salinas, Isla de Puerto Rico, NY) (Tabla 2) y se marcaron con AET (Sigma-Aldrich, Madrid, España) tratados con AET (Sigma-Aldrich).

Se comprobó la pureza de la población mediante el marcaje con anticuerpos específicos para las moléculas CD3 y CD19 (Tabla 2) y se analizó por citometría de flujo, utilizando un citómetro FACSsort y el programa CellQuest® (ambos de BD Immunocytometry Systems, San José, CA). En todos los casos la purificación de las células CD19<sup>+</sup> era superior a un 95%, excepto en el caso de los cordones, que era de un 80%.

### III. INMUNOFENOTIPO

#### *Marcaje directo de moléculas de superficie*

Se empleó la técnica de inmunofluorescencia directa con triple marcaje y posterior análisis por citometría de flujo. Se marcaron  $2 \times 10^5$  LB con 2,5-5  $\mu$ l de cada uno de los anticuerpos (Tabla 2) y se incubaron 20' en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se lavaron dos veces con PBS y se analizaron en el citómetro.



### ***Marcaje intracelular indirecto con ZAP-70***

Partiendo de  $1 \times 10^6$  de CMNs de LLC-B, se añadieron 100  $\mu$ l del reactivo A de un *kit* de fijación y permeabilización celular (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) y se incubaron durante 15' a T ambiente. Después de un lavado con PBS se añadieron 100  $\mu$ l del reactivo B junto con 2  $\mu$ l del anticuerpo anti-ZAP-70 (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY) (Tabla 2), y se incubaron 15' a T ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron y marcaron de nuevo con 10  $\mu$ l de un anticuerpo IgG contra inmunoglobulinas de ratón (GAM) (Tabla 2), marcado con FITC. Después de incubar 20' a T ambiente se añadieron 50  $\mu$ l de suero de ratón (Chemicon Internacional, Temecula, CA). 5' después se realizó un marcaje extracelular para discriminar las distintas poblaciones: CD19 PerCP, CD3 PE y CD56 PE (Tabla 2). Tras un último lavado, se analizaron por citometría de flujo.

### ***Marcaje intracelular directo de fosfotirosinas (PTyr)***

Se lavaron  $1 \times 10^6$  LB de LLC-B, amígdala o cordón con PBS y se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies Inc., Rockville, MD). Tras una incubación con el estímulo correspondiente a distintos tiempos (1', 10' ó 30'), se lavaron con PBS frío y, seguidamente, se incubaron con 100  $\mu$ l de PBS/1% paraformaldehído (Riedel-de Haën AG, Seelze, Alemania) durante 30' a 4° C. Tras lavar de nuevo en frío, se permeabilizaron con 100  $\mu$ l de PBS/0,5% tritón X-100 (Sigma-Aldrich), 10' a T ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavaron e incubaron con 100  $\mu$ l de PBS/0,1% BSA (Sigma-Aldrich)/0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) durante 10' a T ambiente. Tras otro lavado se volvieron a añadir 100  $\mu$ l de PBS/0,5% tritón X-100, esta



**Tabla 2.- Anticuerpos utilizados para los distintos análisis inmunofenotípicos de los linfocitos B por citometría de flujo.**

Especificidad <sup>1</sup>	Fluoróforo <sup>2</sup>	Clon <sup>3</sup>	Casa comercial
Controles de isotipo <sup>4</sup> :			
IgG <sub>1</sub>	FITC/PE/PerCP	X40	BD Biosciences
IgG <sub>2a</sub>	FITC/PE	X39	BD Biosciences
CD3	FITC/PE	SK7	BD Biosciences
CD5	FITC/PE	L17F12	BD Biosciences
CD11a	FITC	G-25.2	BD Biosciences
CD11b	PE	D12	BD Biosciences
CD11c	PE	S-HCL-3	BD Biosciences
CD14	PE	MφP9	BD Biosciences
CD16	PE	B73.1	BD Biosciences
CD19	PerCP	SJ25C1	Caltag Laboratories
CD23	FITC	D3.6	Serotec (Oxford, UK)
CD25	PE	2A3	BD Biosciences
CD29	FITC	B-D15	Diaclone
CD38	FITC	HIT2	BD Pharmingen
CD39	PE	TU66	BD Pharmingen
CD40	FITC	14G7	Caltag Laboratories
CD45	FITC	2D1	BD Biosciences
CD49d	PE	HP2/1	BD Biosciences
CD56	PE	MEM-188	Caltag Laboratories
CD62L	PE	SK11	BD Biosciences
CD69	FITC	L78	BD Biosciences
CD71	PE	T56/14	Caltag Laboratories
HLA-DR	PerCP	L243	BD Biosciences
Fosfotirosinas	FITC	4G10	Upstate cell signaling solutions
ZAP-70	No conjugado	2F3.2	Upstate cell signaling solutions
Goat anti-mouse IgG (GAM)	FITC	Policlonal	BD Biosciences
IgM (μ)	PE	Policlonal	Caltag Laboratories

<sup>1</sup>Molécula contra la que va dirigida el anticuerpo monoclonal.

<sup>2</sup>Fluoróforo conjugado con el anticuerpo.

<sup>3</sup>Clon del que proceden los anticuerpos.

<sup>4</sup>Subclase de los anticuerpos inespecíficos utilizados como controles.



vez junto con 1  $\mu$ l del anticuerpo anti-fosfotirosinas o con 10  $\mu$ l de un anticuerpo control intracelular (Tabla 2), incubándose durante 30' a 4° C. Después de un último lavado con PBS, se analizaron por citometría de flujo.

#### IV. CULTIVOS CELULARES

##### *Entrecruzamiento del CD5 y estimulación con anti-IgM*

Los LB purificados se resuspendieron a  $1 \times 10^6$ /ml en medio completo: RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 2mM de L-glutamina y 1% de antibiótico (100 unidades (U)/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina) (todos suministrados por Gibco). En el caso de los LB de amígdala también se añadieron 15  $\mu$ g/ml de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, NJ). Las células se sembraron en placas con fondo plano de 6, 24 ó 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA), según el tipo de experimento, añadiendo a continuación los correspondientes estímulos propios del BCR:

- Anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> (SBA, Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL).
- SAC (1:60.000) (Pansorbin® Cells, Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA) + IL-2 (20 U/ml) (R&D System, Minneapolis, MN).

Para valorar el efecto modulador del CD5 en la señalización vía BCR, ambos estímulos se emplearon en presencia o ausencia del CD5, utilizando para ello un



anticuerpo marcado con biotina (clon UCHT-2) (BD Pharmingen, San Diego, CA) y su posterior entrecruzamiento con neutravidina (NA) (Pierce, Rockford, IL). Entre 1 y  $5 \times 10^6$  de LB se resuspendieron en 400  $\mu$ l de RPMI/10% FBS, se añadió 1  $\mu$ g de anti-CD5 biotilado por cada  $10^6$  de células y se incubaron a 4° C durante 30' en rotación. Transcurrido este tiempo se lavaron y resuspendieron de nuevo en 400  $\mu$ l de RPMI/10% FBS, añadiendo 20  $\mu$ g de NA por cada  $10^6$  de células. Tras 20' de rotación en frío, se lavaron y resuspendieron en medio completo.

### ***Ensayo de inhibición de la PKC***

Se incubaron los LB de LLC-B durante 1 h a 37° C con un inhibidor de la PKC, la bisindolilmaleimida I (Bis I) (Calbiochem), a una concentración final de 1  $\mu$ M. Transcurrido ese tiempo, se lavaron y resuspendieron en medio completo. Finalmente, las células se sembraron y cultivaron con los siguientes estímulos:

- Anti-CD5 no biotinilado (clon UCHT-2) (BD Pharmingen), incubando durante 30' en frío y lavando posteriormente.
- PMA (Sigma-Aldrich), un estímulo específico para la activación de la vía de PKC, a una concentración final de 10 ng/ml.

Antes de su utilización se preparó una solución concentrada de Bis I resuspendida en dimetil sulfóxido (DMSO). Al emplearla en los cultivos, la concentración de DMSO no excedía el 0,02%. Así, a las células utilizadas como control también se les añadió 0,02% de DMSO.



## V. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS

### *Doble marcaje con anexina V/Ioduro de propidio (IP)*

En cada una de las condiciones experimentales se cuantificaron la viabilidad y la apoptosis de las células B mediante doble marcaje con anexina V-FITC/ioduro de propidio (IP) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, y Sigma-Aldrich, respectivamente). Se incubaron  $2 \times 10^5$  LB durante 15' y en oscuridad con 50  $\mu$ l de una solución que contenía: 5  $\mu$ l de anexina V-FITC, 1  $\mu$ g/ml de IP, 140 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10 mM de Hepes (los tres últimos proporcionados por Sigma-Aldrich), en un volumen final de 500  $\mu$ l. Seguidamente, las células se analizaron por citometría de flujo con el programa Cell Quest®.

## VI. MEDIDA DE PROLIFERACIÓN

### *Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)*

A las 72 h de cultivo se añadió al pocillo BrdU a una concentración final de 60  $\mu$ M. Transcurridas 18 h, las células se recogieron y lavaron con PBS/20 mM EDTA (Sigma-Aldrich) frío. Seguidamente se fijaron y permeabilizaron utilizando el *kit* de fijación y permeabilización celular de Dako. Los lavados se realizaron con PBS/1% BSA/0,1% azida sódica (Sigma-Aldrich). A continuación, se añadieron 20  $\mu$ l de anti-BrdU FITC con ADNasa (clon B44, BD Biosciences) por cada  $10^6$  células. Las células se incubaron durante 30' a T ambiente para finalmente lavarlas y analizarlas en el citómetro.



## VII. TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Se extrajo el ARN total de  $5 \times 10^6$  de linfocitos B de pacientes de LLC-B, de LCM y de amígdalas por el método del isotiocianato de guanidina<sup>123</sup>, utilizando como reactivo TRIzol (Gibco). Se desnaturalizaron de 1 a 5 µg del ARN total a 65° C durante 15' y se sintetizó el ADN complementario (ADN<sub>c</sub>) mediante transcripción inversa. La reacción se llevó a cabo en presencia de 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,2 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfato (dNTPs), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,6 µg de *random primers*, 50 U de inhibidores de ribonucleasas, y 20 U de la enzima AMV (Roche Diagnostics), en un volumen final de 10 µl.

La amplificación de los fragmentos de los genes de la familia de *bcl-2* y de las citocinas (IL-2 e IL-10) se realizó añadiendo al tubo de ADN<sub>c</sub> 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,4 µM de los cebadores específicos para cada gen (TIB BIOMOL, Berlín, Alemania) (Tabla 3) y 1,5 U de *Taq* polimerasa (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia), en un volumen final de 50 µl. Para poder comparar la expresión génica de cada situación experimental se realizó una co-amplificación con un gen de expresión constante, el *ARN18S* (*kit* de Ambion, Huntingdon, UK), utilizándose cantidades de cebadores y competímeros optimizadas para cada caso.



Tabla 3.- Cebadores, condiciones de amplificación y tamaño de los fragmentos para los productos génicos de la familia de *bcl-2* y de las interleucinas IL-2 e IL-10.

Gen	Cebadores	Programa de amplificación				Fragmento (pb)
<i>bcl-2</i>	Secuencia 5' 5' GGAAAGGCTAAATACAAGC 3'	5' a 95° C				
	Secuencia 3' 5' ATTGTTCTCCCTCCACCC 3'	25 ciclos: 10' a 72° C	45° a 95° C	45° a 65° C	2' a 72° C	259
<i>mcl-1</i>	Secuencia 5' 5' GAGGAGGAGGAGGAAGTT 3'	5' a 95° C				
	Secuencia 3' 5' ACCAGCTCCTACTCCAGCAA 3'	25 ciclos: 10' a 72° C	45° a 95° C	45° a 65° C	2' a 72° C	531
<i>bax</i>	Secuencia 5' 5' ATGGAGGTCGGGAGCAGC 3'	5' a 95° C				
	Secuencia 3' 5' CCCAGTTGAAGTTGCTCAG 3'	25 ciclos: 10' a 72° C	45° a 95° C	45° a 65° C	2' a 72° C	323
<i>bcl-x<sub>L</sub></i>	Secuencia 5' 5' TTGGACAATGGACTGGTTGA 3'	5' a 95° C				
	Secuencia 3' 5' GTAGAGTGGATGGTCAGTG 3'	5 ciclos: 25 ciclos: 7' a 72° C	30° a 95° C 30° a 95° C	30° a 65° C 30° a 60° C	45° a 72° C 45° a 72° C	780
<i>IL-2 e</i>	Secuencia 5' IL-2 5' TGCAACTCCTGTCTGCATT 3'					
	Secuencia 3' IL-2 5' ATGTTGCTGTCTCATCAGC 3'	5' a 95° C				IL-2 391
<i>IL-10</i>	Secuencia 5' IL-10 5' GGCACCCAGTCTGAGAACAG 3'	28 ciclos: 10' a 72° C	45° a 95° C	45° a 60° C	2' a 72° C	IL-10 295
	Secuencia 3' IL-10 5' GCCTGAGGGTCTTCAGGTTG 3'					

El programa de amplificación para cada uno de los productos se detalla en la tabla 3. El termociclador utilizado para las amplificaciones fue un GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA).

Cada uno de los productos amplificados se sometió a una electroforesis en un gel al 2% de agarosa Nusiève 3:1 (FMC Bioproducts, Risingevej, Dinamarca) en presencia de 0,5x tris bórico (ambos de Sigma-Aldrich) EDTA (TBE) y 0,5 µg/ml de bromuro de



etidio (Sigma-Aldrich). La cuantificación de las bandas visualizadas se llevó a cabo mediante un análisis relativo, comparando la intensidad de la banda de interés con la del *ARN18S*. Para ello se utilizó el programa Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA).

## **VIII. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE IL-2 E IL-10**

Se cuantificó la producción de IL-10 e IL-2 en el sobrenadante de cultivo, en distintas condiciones experimentales. Para ello se utilizó un *kit* de ELISA específico para cada citocina (Quantikine®; R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó en el lector de ELISA Anthos 2010 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria).

## **IX. ESTUDIO DEL ESTADO MUTACIONAL DE LAS IgV<sub>H</sub>**

Se extrajo el ARN total de  $5 \times 10^6$  de LB de pacientes de LLC-B y a partir de 1-5 µg de este ARN se sintetizaron 10 µl ADN<sub>C</sub> mediante transcripción inversa.

La amplificación de los fragmentos de los genes de las V<sub>H</sub> se realizó añadiendo al tubo de ADN<sub>C</sub> 25 mM KCl, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub> y 10mM Tris-HCl (pH 8,85), 1 µM de cada uno de los cebadores específicos (TIB BIOMOL) (Tabla 4), 0,2 mM de dNTPs y 1,5 U de *Pwo* ADN polimerasa (Roche Diagnostics), en un volumen final de 50 µl. El programa de amplificación se detalla en la tabla 4.



El producto amplificado se sometió a una electroforesis en un gel al 2% de agarosa Nusieve 3:1. Se extrajo la banda de interés y se purificó el ADN con un *kit* de extracción de ADN (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN se resuspendió en agua y se ajustó la concentración a 10 ng/μl. Se realizó una secuenciación directa de los fragmentos de la PCR en un secuenciador ABIPRISM 3730 (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Tabla 4.- Cebadores y programa de amplificación utilizados para la amplificación de los genes  $V_H$  de las inmunoglobulinas.

Cebador	Secuencia	Programa de amplificación
<i>HV1BACK</i>	5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG 3'	
<i>HV2BACK</i>	5' CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTG 3'	
<i>HV3BACK</i>	5' GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG 3'	
<i>HV4BACK</i>	5' CAGGTGCAGCTGCAGGAGTG 3'	5' a 94° C
<i>HV5BACK</i>	5' GAGGTGCAGCTGCTGCAGTCTG 3'	35 ciclos: 1' a 94° C 1' a 56° C 1' a 72° C
<i>HV6BACK</i>	5' CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG 3'	10' a 72° C
<i>HJ12BACK</i>	5' TGAGGAGAGTGACCAGGGTGCC 3'	
<i>HJ3BACK</i>	5' TGAAGAGAGTGACCATTGTCCC 3'	
<i>HJ45BACK</i>	5' TGAGGAGAGTGACCAGGGTTCC 3'	
<i>HJ6BACK</i>	5' TGAGGAGAGTGACTGGTCCC 3'	

Los resultados se analizaron con el programa Chromas v. 1.45 (Queensland, Australia) y la secuencia obtenida se comparó con las recogidas en las bases de datos de líneas germinales de las  $IgV_H$  (Ig Blast e IMGT). Se consideró que la  $IgV_H$  estaba mutada cuando el porcentaje de homología con la línea germinal era menor o igual al 98%.



## **X. ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)**

Para determinar la expresión proteica de genes anti-apoptóticos y de fosfotirosinas se lisaron  $10 \times 10^6$  de LB tumorales y de amígdala de cada una de las condiciones experimentales. Por cada  $10^6$  células se añadieron 10  $\mu$ l de una solución de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40 e inhibidores de proteasas (1 mM ortovanadato sódico, 10  $\mu$ g/ml pepstatina, 2 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptina y 10  $\mu$ g/ml aprotinina, todos de Sigma-Aldrich). Se incubó durante 20' a 4° C y, transcurrido este tiempo, se centrifugó 10' a 13.000 g y a 4° C para eliminar el material insoluble.

La concentración proteica se cuantificó mediante el sistema BCA (Pierce), basado en la reacción de Biuret<sup>124</sup>, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó un lector de ELISA.

Aproximadamente un total de 10 a 15  $\mu$ g de las proteínas desnaturalizadas a 95° C durante 5' se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida (Amersham Biosciences) al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS (Sigma-Aldrich)-PAGE), utilizando un sistema de electroforesis Hoefer Mini VE (Amersham Biosciences). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences), durante 1 h y 15' y a un amperaje constante de 300 mA.

Se bloqueó la membrana durante 2 h, para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, con una solución al 5% de leche desnatada en polvo en PBS/0,1% Tween-



20, en el caso de las fosfotirosinas se utilizó al 4% de BSA. A continuación, la membrana se incubó toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios (Tabla 5) diluidos en la solución de bloqueo. Después de tres lavados de 10' con PBS/0,1% Tween-20, se incubó 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, un anti-IgG conjugado con peroxidasa (Tabla 5).

Tabla 5.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante *Western blot*.

Especificidad	Clon	Fuente	Dilución	Casa comercial
<b>Anticuerpos primarios</b>				
$\beta$ -Actina	AC-15	Ratón	1/50.000	Sigma-Aldrich
Bcl-x <sub>L</sub>	2H12	Ratón	1/500	Sigma-Aldrich
Mcl-1	Policlonal	Conejo	1/8.000	Sigma-Aldrich
XIAP	Clon 2F1	Ratón	1/1.000	MBL
Fosfotirosinas	Clon 4G10	Ratón	1/1.000	Upstate Cell Signaling Solutions
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
IgG de conejo-HRP <sup>1</sup>	Policlonal	Mono	1/50.000	Amersham Biosciences
IgG de ratón-HRP	Policlonal	Oveja	1/20.000	Amersham Biosciences

<sup>1</sup>Peroxidasa de rábano

Tras lavar tres veces, se detectaron las bandas de interés mediante un ensayo de quimioluminiscencia con ECL + Plus (Amersham Biosciences), incubando durante 5' en oscuridad. Tras la impresión en una placa de autorradiografía (Amersham Biosciences) y el revelado manual de la película fotográfica, se cuantificó la banda refiriéndola a la  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga, y mediante el programa Quantity One®. También se obtuvo una imagen con un Chemidoc (Bio-Rad Laboratories) para posteriormente analizarla con el programa Quantity One®.



## **XI. POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DEL CD5**

### **Extracción de ADN**

Se extrajo ADN de 134 pacientes con LLC-B y de 47 pacientes con LCM. Para ello, se lisaron  $5 \times 10^6$  células con SDS al 10%, se trataron con proteinasa K y con ARNasa (ambos de Roche Diagnostics) libre de ADNasa, para la posterior extracción del ADN genómico por el método del fenol-cloroformo (Sigma-Aldrich)<sup>125</sup>. Como control se utilizó el ADN de 102 individuos sanos voluntarios.

### **Análisis del polimorfismo**

El microsatélite del promotor del CD5 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores *PromCD5* 5' 5'CTCTACATGGAGCTCACACATA3' y *PromCD5* 3' 5'CATGAATGCTGGGCTTGTGC3' (TIB BIOMOL)<sup>87</sup>. La amplificación se llevó a cabo con 100 ng de ADN, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de los cebadores y 1,25 U la enzima *Taq* polimerasa, en un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de la PCR incluían una desnaturalización previa de 5' a 95°C; 30 ciclos de 15" a 95°C, 30" a 60°C y 1' a 72°C; seguidos de 10' de elongación final a 72°C.

Se mezcló 1 µl del producto amplificado con cuatro fragmentos de ADN de longitud conocida (130, 150, 210 y 220 bases), extraídos a partir de un marcador de 10



pb (Life Technologies, Rockville, MD), con el propósito de utilizarlo como marcador interno en cada calle del gel. Además, en cada gel se incluyó una muestra previamente genotipada, para asegurar la reproducibilidad de los datos. La muestra se separó en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes (GeneGel HyRes Starter Kit; Amersham Biosciences), a 300 V, 12 mA y 50° C. Posteriormente, los geles se revelaron con un *kit* de tinción de plata, según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences).

Los alelos se asignaron mediante el análisis de las bandas con el programa Quantity One®. La longitud del fragmento amplificado se estimó a partir del marcador interno de longitud conocida y se calculó el número de repeticiones CA.

## **XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v. 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para Windows. Inicialmente se comprobó si las muestras cumplían el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de medias se realizó mediante el test de la t-Student cuando el tamaño de la muestra era mayor o igual a 10, y mediante el test de Wilcoxon o el test no paramétrico de Mann-Whitney cuando era menor o no seguía una distribución normal.

El test de equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosidad y las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del promotor del CD5 se calcularon con un programa para el análisis de datos genéticos de poblaciones<sup>126</sup>. Las frecuencias genotípicas se compararon por el test de la  $\chi^2$  y la fuerza de asociación se midió con la



odd ratio (OR) y los límites exactos para los intervalos de confianza al 95% (IC 95%). Los alelos que aparecían menos de cuatro veces en la población, fueron excluidos de los análisis.

En todos los casos, se consideró que la  $p$  era estadísticamente significativa cuando tenía un valor menor de 0,05.



## 1. ESTUDIO DE LA INIBICIÓN DEL BCR MEDIADA POR CD5

### *El estrechamiento del CD5 no rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a las LB de LLC-B*

Algunos de los trabajos publicados en la literatura indican que las LB de LLC-B sufren apoptosis cuando son estimuladas con anti-IgM<sup>10,11</sup>. Dado que está documentado que el estrechamiento de CD5 del BCR rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a los linfocitos B-1 de ratón<sup>12</sup>, uno de los objetivos que se propone en este trabajo fue verificar si ocurría lo mismo en células B de LLC-B. Para este se debe restringir la expresión de la flaca del CD5 y del receptor de antígeno, por ello se incubó con un anticuerpo anti-CD5 bifuncional y, posteriormente, se estimuló con antígeno. A continuación, se cultivaron las LB de 7 muestras de LLC-B con un anticuerpo anti-IgM Pfab'y a 10 µg/ml con o sin estrechamiento de CD5. Como control se usó a un anticuerpo irrelevante adecuado, un IgG, clones B2-1 (Dianova Research, Buenos Aires, Argentina) en el caso de anti-CD5 y un Pfab'y polyclonal (Caling Laboratorios) en el de anti-IgM. Se clasificó la viabilidad celular a las 48 h de cultivo.

## RESULTADOS

Antes de comenzar el experimento se cultivaron LB de muestras de LLC-B y de 4 C3 como poblaciones control, ya que ambas son ricas en células B-1 CD5<sup>+</sup>.

Se observó que la estimulación con anti-IgM producía apoptosis en todas las poblaciones celulares y que el estrechamiento de CD5 no rescataba a las LB de LLC-B de esta apoptosis en ninguno de los casos estudiados (Figura 1a). Por el contrario, era capaz de rescatar a las LB de amigdalas en 4 de las 5 muestras (Figura 1b). En las LB



## **I. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DEL BCR MEDIADA POR CD5**

### ***El entrecruzamiento del CD5 no rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a los LB de LLC-B***

Algunos de los trabajos publicados en la literatura indican que los LB de LLC-B sufren apoptosis cuando son estimulados con anti-IgM<sup>69,70</sup>. Dado que está descrito que el alejamiento de CD5 del BCR rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a los linfocitos B-1 de ratón<sup>39</sup>, uno de los objetivos que se propuso en este trabajo fue estudiar si ocurría lo mismo en células B de LLC-B. Para esto se debía conseguir la separación física del CD5 y del receptor de antígeno, por ello se incubó con un anticuerpo anti-CD5 biotinilado y, posteriormente, se entrecruzó con neutravidina. A continuación, se cultivaron los LB de 7 muestras de LLC-B con un anticuerpo anti-IgM F(ab')<sub>2</sub> a 10 µg/ml con o sin entrecruzamiento de CD5. Como control se utilizó un anticuerpo irrelevante adecuado, un IgG<sub>1</sub> clon BZ-1 (Diacclone Research, Besançon, Francia) en el caso de anti-CD5 y un F(ab')<sub>2</sub> policlonal (Caltag Laboratories) en el de anti-IgM. Se cuantificó la viabilidad celular a las 48 h de cultivo por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V FITC/IP. Se utilizaron LB no tumorales de 5 amígdalas y de 4 CU como poblaciones control, ya que ambas son ricas en células B CD5<sup>+</sup>.

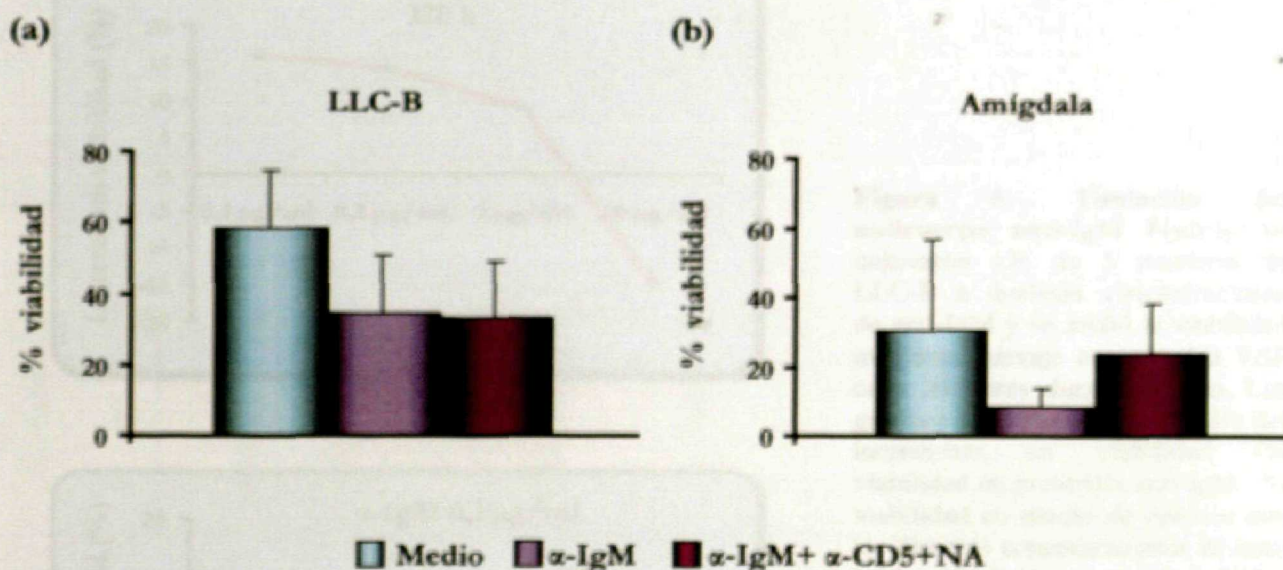
Se observó que la estimulación con anti-IgM producía apoptosis en todas las poblaciones celulares y que el entrecruzamiento de CD5 no rescataba a los LB de LLC-B de esta apoptosis en ninguno de los casos estudiados (Figura 5a). Por el contrario, sí era capaz de rescatar a los LB de amígdala en 4 de las 5 muestras (Figura 5b). En los LB



de CU no se observó ningún efecto, dado que la viabilidad en todas las condiciones era menor del 7% (no se muestran los datos).

Estos resultados sugerían que el CD5 en LB de LLC-B no funcionaba correctamente, o al menos no se comportaba de igual manera que en las células control.

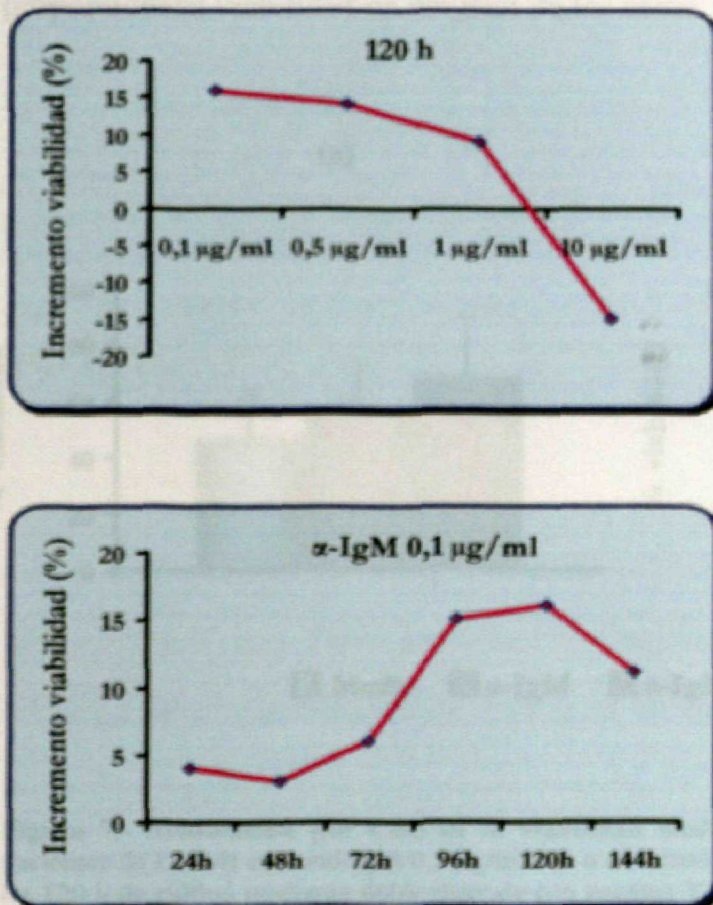
Como en las condiciones control no se encontraron diferencias con respecto a la condición en la que sólo había medio de cultivo, a partir de este momento, para simplificar, se denominará “medio” a la condición control, que engloba el control irrelevante de anti-IgM y el de anti-CD5.



**Figura 5.- Modulación por CD5 de la apoptosis mediada por el BCR.** Se estimularon LB de 7 pacientes de LLC-B y de 5 amígdalas de individuos sanos con anti-IgM ( $\alpha$ -IgM) 10  $\mu$ g/ml con o sin entrecruzamiento de CD5 ( $\alpha$ -CD5+NA). Se midió la viabilidad a las 48 h de cultivo mediante doble marcaje con anexina V/IP. Los gráficos representan el valor medio  $\pm$  desviación estándar (DE) del porcentaje de viabilidad de cada una de las condiciones experimentales en LB de LLC-B (a) o de amígdala (b).



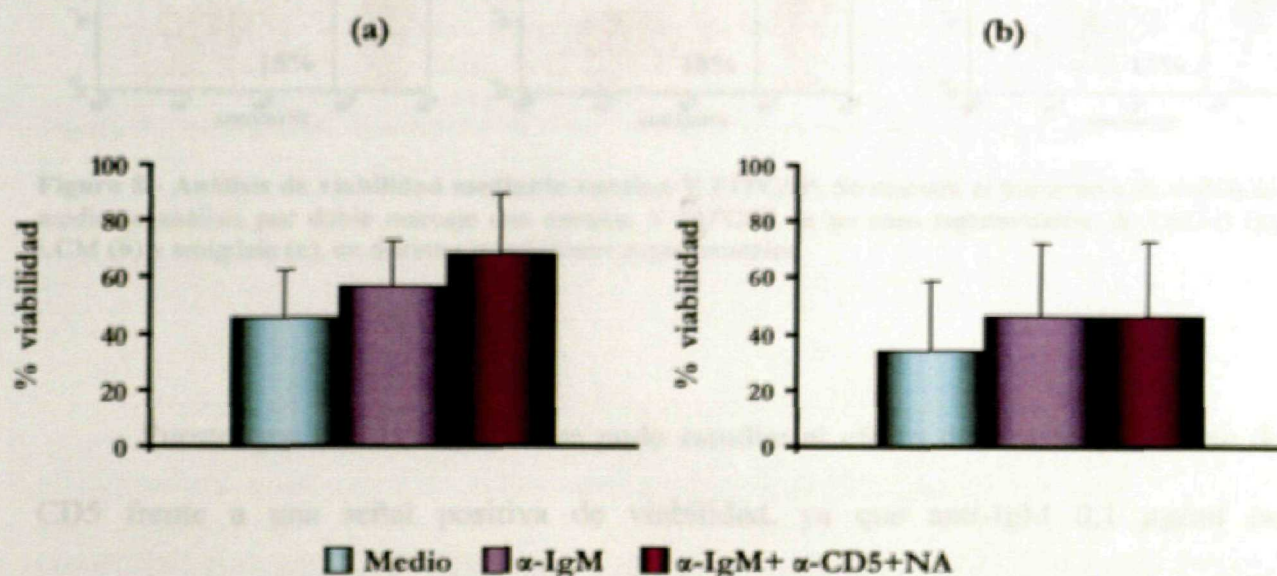
Además de la apoptosis inducida por anti-IgM, se ha descrito que es posible inducir señales de viabilidad en LB de LLC-B utilizando anticuerpos anti-IgM en determinadas condiciones experimentales<sup>127</sup>. Con este dato, se quiso analizar si el entrecruzamiento de CD5 era o no capaz de modular estas señales de viabilidad. Para ello se cultivaron LB purificados de 5 pacientes con LLC-B en ausencia o presencia de anti-IgM a concentraciones crecientes. Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular mediante anexina V FITC/IP cada 24 h, hasta un total de 144 h. Los resultados mostraban que anti-IgM proporcionaba viabilidad a bajas concentraciones (Figura 6a) y a tiempos largos (Figura 6b).



**Figura 6.- Titulación del anticuerpo anti-IgM F(ab')<sub>2</sub>.** Se cultivaron LB de 5 muestras de LLC-B a distintas concentraciones de anti-IgM y se midió la viabilidad mediante marcaje con anexina V/IP cada 24 horas durante 6 días. Los gráficos muestran el valor medio del incremento en viabilidad (% viabilidad en presencia anti-IgM - % viabilidad en medio de cultivo) con las distintas concentraciones de anti-IgM a 120 h (a) o con anti-IgM 0,1 µg/ml a distintos tiempos (b).

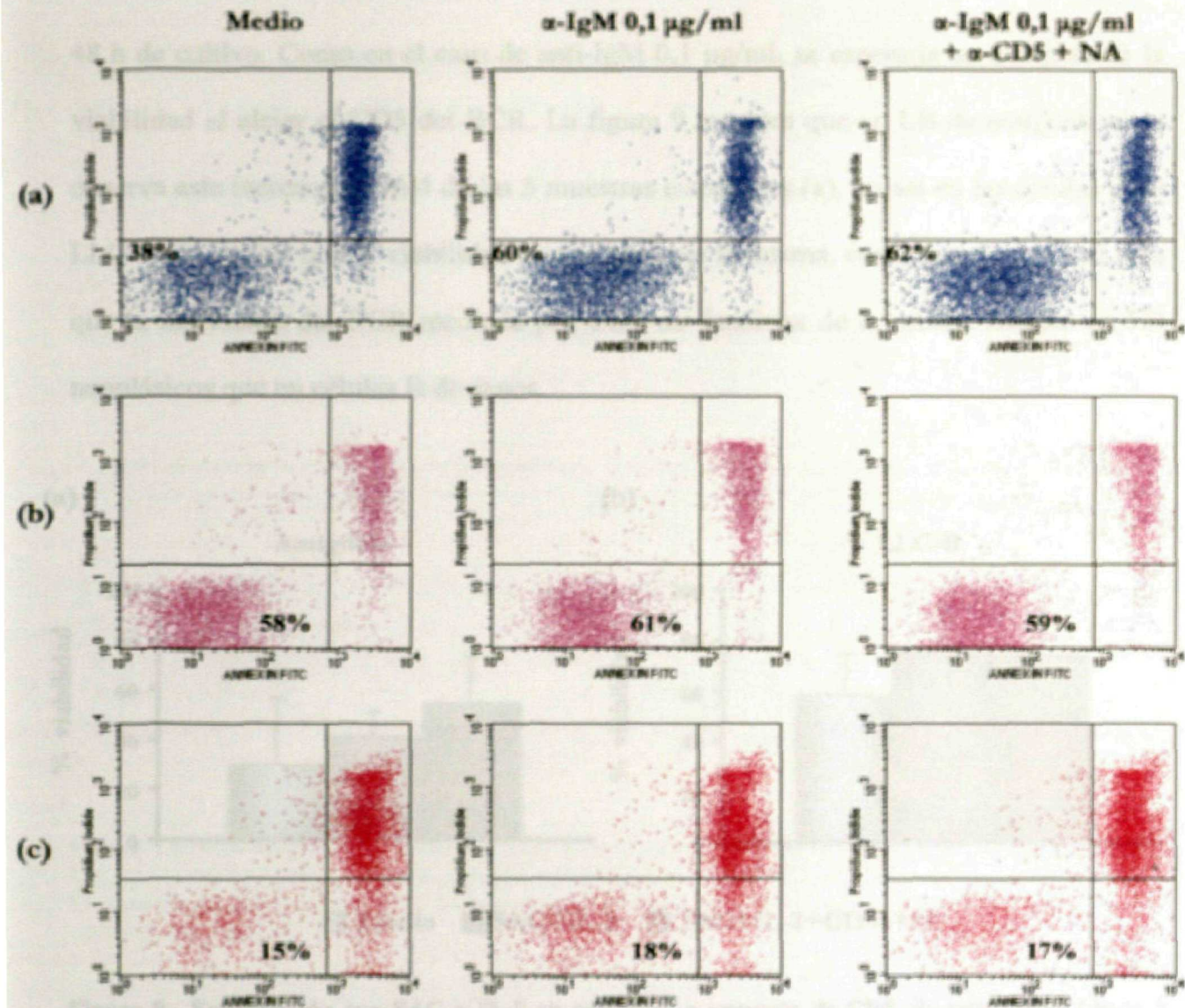


En vista de estos resultados, se cultivaron los LB de 28 muestras de LLC-B y 6 de amígdala con 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgM durante 120 h. Para comprobar si el comportamiento diferencial observado en LLC-B era común a otras células tumorales CD5<sup>+</sup> o, por el contrario, era característico de esta neoplasia, se utilizaron como control adicional 8 muestras de LCM, enfermedad linfoproliferativa que también se caracteriza por la expresión de esta molécula en los LB. Lo que se esperaba encontrar es un aumento de la viabilidad al entrecruzar el CD5 pero, como se puede observar en la figura 7, la viabilidad con anti-IgM con o sin CD5 entrecruzado era la misma en 25 de los 28 casos analizados de LLC-B (a), tan sólo aumentaba ligeramente en tres de las muestras (b). En el caso del LCM, anti-IgM tan sólo proporcionaba viabilidad a una de las muestras y no aumentaba tras la separación del CD5. En los LB de amígdala no proporcionaba viabilidad en ninguno de los casos. (Figura 8)



**Figura 7.- Modulación por CD5 de la viabilidad mediada por el BCR.** Se cultivaron LB de 28 pacientes de LLC-B con anti-IgM 0,1  $\mu\text{g/ml}$  con o sin entrecruzamiento de CD5. Se midió la viabilidad a las 120 h de cultivo mediante doble marcaje con anexina V/IP. Los gráficos representan el valor medio  $\pm$  DE del porcentaje de viabilidad en cada condición experimental. De las 28 muestras, el entrecruzamiento de CD5 produce un ligero aumento en la viabilidad mediada por anti-IgM en tan sólo 3 casos (b), en el resto la viabilidad es la misma (a).



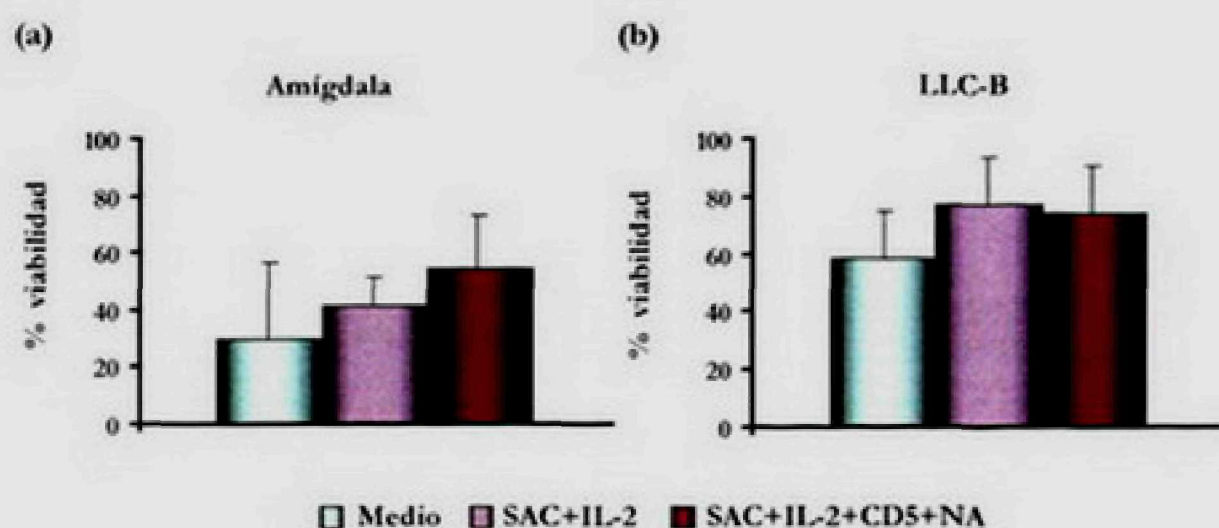


**Figura 8.- Análisis de viabilidad mediante anexina V FITC/IP.** Se muestra el porcentaje de viabilidad mediante análisis por doble marcaje con anexina V FITC/IP de un caso representativo de LLC-B (a), LCM (b) y amígdala (c), en distintas condiciones experimentales.

Puesto que en LB sanos no se pudo estudiar el efecto del entrecruzamiento de CD5 frente a una señal positiva de viabilidad, ya que anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml no proporcionaba viabilidad a las células B de amígdala, se recurrió a SAC + IL-2, estímulo mitogénico que aumenta la viabilidad tanto en LB de amígdala como de LLC-B<sup>128</sup>. Se cultivaron las células B de 7 muestras de LLC-B y de 5 amígdalas con SAC + IL-2 con o sin CD5 entrecruzado, midiendo la viabilidad con anexina V FITC/IP a las



48 h de cultivo. Como en el caso de anti-IgM 0,1 µg/ml, se esperaría un aumento de la viabilidad al alejar el CD5 del BCR. La figura 9 muestra que en LB de amígdala sí se observa este incremento en 4 de las 5 muestras estudiadas (a), no así en las células B de LLC-B (b), en las que la viabilidad es exactamente la misma, confirmando una vez más que la inhibición del BCR mediada por CD5 no funciona de la misma manera en LB neoplásicos que en células B de sanos.

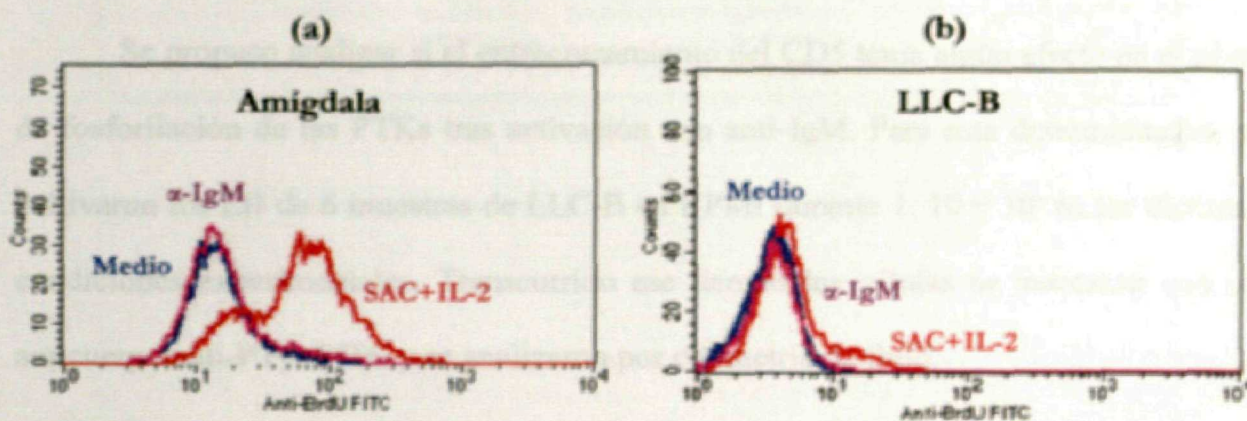


**Figura 9.- Estimulación con SAC + IL-2 en presencia o ausencia de CD5.** Se estimularon LB de 7 pacientes de LLC-B y de 5 amígdalas de individuos sanos con SAC + IL-2 con o sin entrecruzamiento de CD5. Se midió la viabilidad a las 48 h de cultivo mediante doble marcaje con anexina V/PI. Los gráficos representan el valor medio  $\pm$  DE del porcentaje de viabilidad de cada una de las condiciones experimentales en LB de amígdala (a) o de LLC-B (b).

Varios estudios en LB de amígdala han demostrado que el entrecruzamiento de CD5 produce un aumento de la respuesta proliferativa frente a anti- $\mu$  + IL-2<sup>113,114</sup>. Para comprobar si la viabilidad observada al tratar con anti-IgM o SAC + IL-2 era debida a proliferación, se cultivaron los LB de 6 individuos con LLC-B en presencia o ausencia de los correspondientes estímulos. Seguidamente se analizó el porcentaje de células proliferantes mediante incorporación de BrdU y posterior marcaje con un anticuerpo anti-BrdU FITC. Como controles se utilizaron 3 muestras de amígdalas.



Tan sólo se inducía proliferación en LB de amígdala al cultivar con SAC + IL-2, siendo la media de un 76% (Figura 10a). En LB de LLC-B se observó un 74% de células proliferantes en 1 de las 6 muestras estimuladas con SAC + IL-2, mientras que en el resto la media era de un 6% (Figura 10b). En ningún caso, ni en LLC-B ni en amígdala, se encontró proliferación al estimular con anti-IgM.



**Figura 10.- Proliferación inducida por SAC + IL-2.** Se midió la tasa de proliferación en 6 muestras de LLC-B y 3 de amígdalas, mediante incorporación de BrdU y posterior marcaje con un anti-BrdU FITC. Se muestra un caso representativo de la proliferación inducida con anti-IgM 0,1  $\mu\text{g/ml}$  o SAC + IL-2 en amígdala (a) y en LLC-B (b).

Con estos datos, podemos decir que el incremento de viabilidad inducido por anti-IgM se debe a un mantenimiento de la misma y no a un efecto de la proliferación. Estos resultados parecen indicar que algo falla en la inhibición del BCR mediada por CD5 en los LB de LLC-B, lo que podría contribuir a la expansión del clon maligno en esta enfermedad.

#### **El entrecruzamiento del CD5 no incrementa el nivel de PTKs fosforiladas**

Las PTKs juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento y de la diferenciación celular y están profundamente involucradas en oncogénesis<sup>129</sup>. Estas

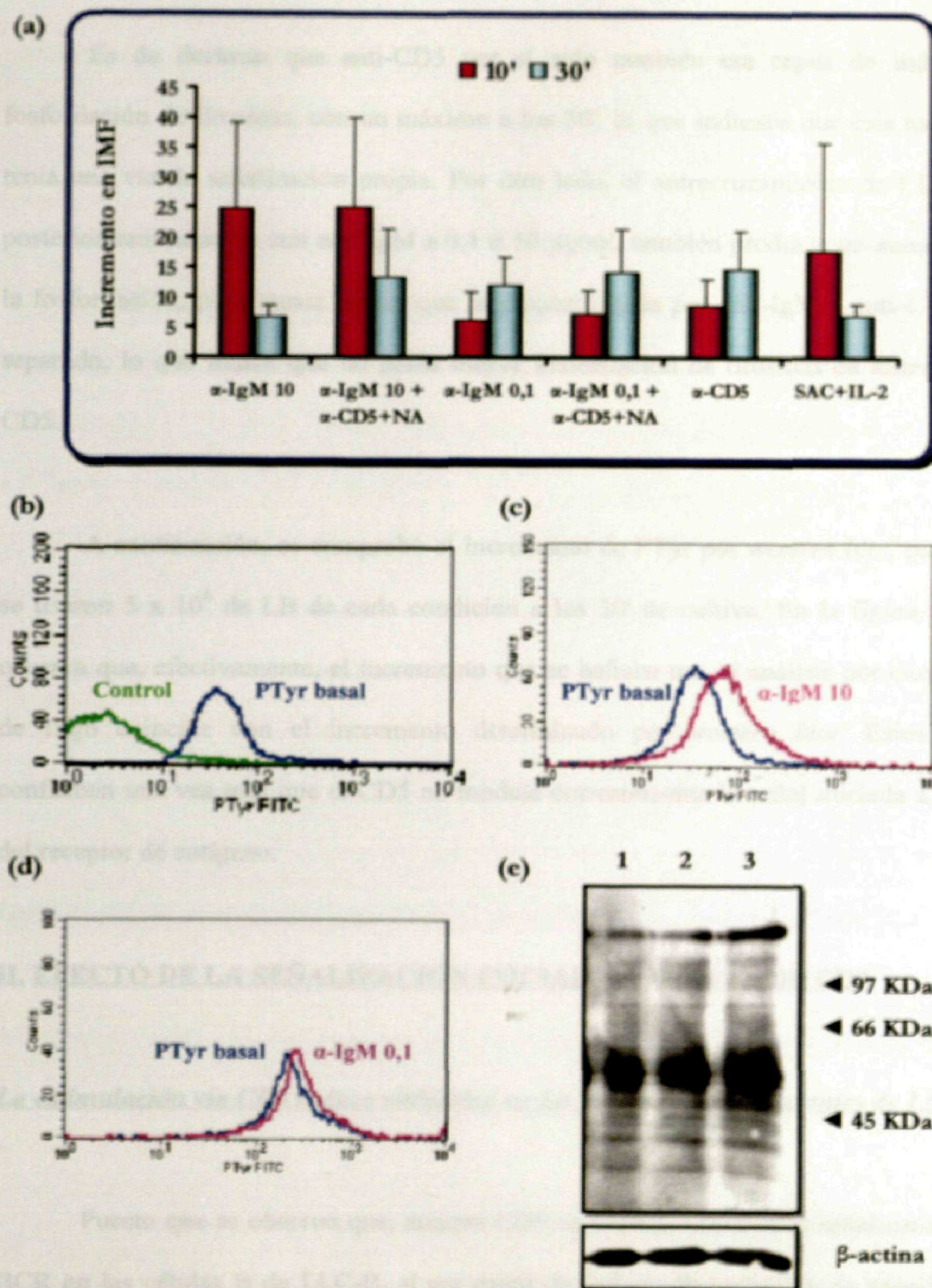


proteínas permanecen inactivas hasta que un ligando se une a su receptor en la superficie celular, lo cual conduce a una serie de efectos intracelulares, incluyendo la estimulación de otras tirosina kinasas. Según los datos que se conocen sobre el CD5, parece que su función es inhibir la fosforilación de las PTKs cuando el BCR es activado, disminuyendo así la señal que llega al interior de la célula<sup>107,108</sup>.

Se propuso analizar si el entrecruzamiento del CD5 tenía algún efecto en el nivel de fosforilación de las PTKs tras activación con anti-IgM. Para esta determinación, se cultivaron los LB de 6 muestras de LLC-B en RPMI durante 1, 10 y 30' en las distintas condiciones experimentales. Transcurrido ese tiempo las células se marcaron con un anticuerpo anti-PTyr FITC y se analizaron por citometría de flujo.

Las PTyr permanecen inactivas hasta que se produce la unión del ligando al receptor, sin embargo, lo primero que llamaba la atención era la fosforilación constitutiva de las mismas en LB de LLC-B, con una media del 86% (Figura 11b). Por ello, para analizar la expresión de PTyr en respuesta a los estímulos se calculó la diferencia entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de PTyr de las células en presencia o ausencia de estímulo. Como puede apreciarse en la figura 11a, se observa un aumento de PTyr en todos los casos, siendo la fosforilación más baja a 1' que a 10' ó 30'. Además, en presencia de anti-IgM a 10 µg/ml (Figura 11c) o SAC + IL-2 se alcanzaba el máximo de fosforilación a los 10', mientras que con anti-IgM a 0,1 µg/ml (Figura 11d) se observaba a los 30'.





**Figura 11.- Fosforilación de PTKs en LB de LLC-B.** Se cultivaron LB de 6 pacientes de LLC-B en distintas condiciones y se marcaron con un anticuerpo anti-PTyr FITC. El gráfico representa el valor medio  $\pm$  DE del incremento en intensidad media de fluorescencia (IMF) de PTyr (IMF PTyr estímulo - IMF expresión basal de PTyr) (a). Abajo se muestra un caso representativo de expresión de PTyr basales (b), a los 10' en LB estimulados con anti-IgM 10  $\mu$ g/ml (c) o a los 10' en LB estimulados con anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml (d). También se muestra un ejemplo del análisis de PTyr por *western blot*, referido a la  $\beta$ -actina de expresión constante. 1. Medio, 2. Anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml, 3. Anti-CD5 (e).



Es de destacar que anti-CD5 por sí solo también era capaz de inducir la fosforilación de tirosinas, con un máximo a los 30', lo que indicaba que esta molécula tenía una vía de señalización propia. Por otro lado, el entrecruzamiento de CD5 y la posterior estimulación con anti-IgM a 0,1 ó 10 µg/ml, también producía un aumento de la fosforilación, pero nunca mayor que la proporcionada por anti-IgM o anti-CD5 por separado, lo que indica que no había mayor fosforilación de tirosinas en ausencia de CD5.

A continuación, se comprobó el incremento de PTyr por *western blot*, para ello se lisaron  $5 \times 10^6$  de LB de cada condición a los 30' de cultivo. En la figura 11e se observa que, efectivamente, el incremento que se hallaba tras el análisis por citometría de flujo coincide con el incremento determinado por *western blot*. Estos datos confirman una vez más que el CD5 no modula correctamente la señal iniciada a través del receptor de antígeno.

## **II. EFECTO DE LA SEÑALIZACIÓN INICIADA A TRAVÉS DE CD5**

### ***La estimulación vía CD5 induce viabilidad en los LB de algunos pacientes de LLC-B***

Puesto que se observó que, aunque CD5 no parecía modular la señalización del BCR en las células B de LLC-B, sí era capaz de inducir fosforilación de tirosinas, el siguiente paso fue estudiar su vía de señalización. En primer lugar se propuso analizar el efecto que producía la estimulación con un anticuerpo anti-CD5 en la viabilidad. Para este ensayo se purificaron los LB de 44 muestras de pacientes de LLC-B, 12 de



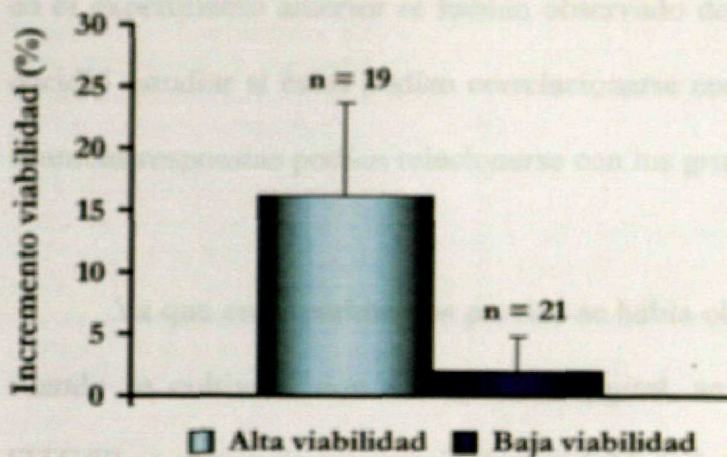
pacientes con LCM y 7 de amígdalas de individuos sanos. Se midió la viabilidad con anexina V FITC/IP cada 24 h hasta un total de 144 h.

A las 48 h se observó un descenso de la viabilidad en 5 muestras de LLC-B, mientras que en el resto permanecía igual que al inicio del cultivo. Esto parecía concordar con lo descrito por Pers *et al.*<sup>116</sup> y Cioca y Kitano<sup>117</sup>, los cuales dividen las muestras de LLC-B en dos grupos según la respuesta a anti-CD5: un grupo en el que los LB sufren apoptosis y otro en el que no.

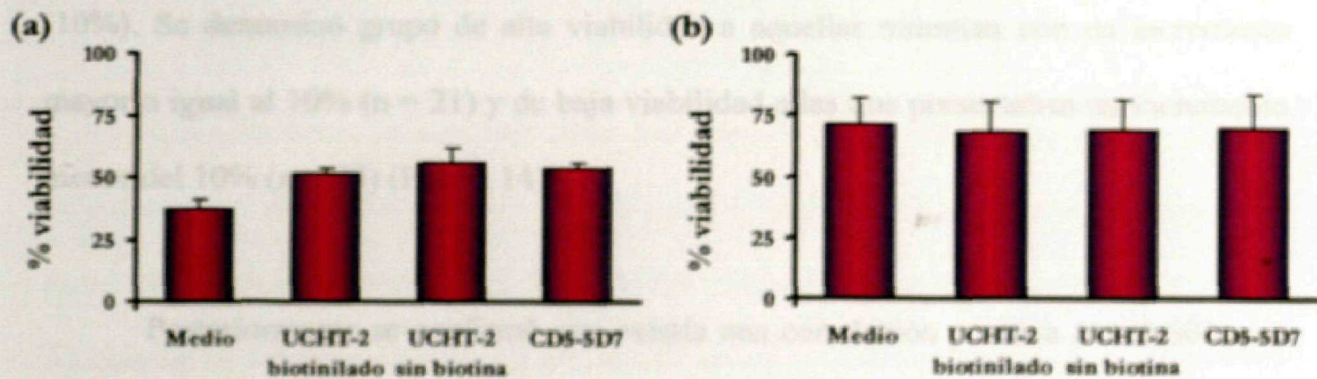
Por el contrario, el análisis a las 120 h indicaba que anti-CD5 inducía apoptosis en 4 muestras de LLC-B, mientras que en el resto o proporcionaba viabilidad o no tenía ningún efecto. En los LB de amígdala nunca aumentaba la viabilidad en presencia de anti-CD5, y en el caso del LCM sólo en 2 de 12 casos analizados. Con estos datos, las muestras de LLC-B se dividieron en dos grupos según la respuesta a anti-CD5. Se tomó como punto de corte la mediana (8%), se denominó grupo de alta viabilidad ( $n = 19$ ) a aquél en el que el incremento era igual o mayor al 8% y de baja viabilidad ( $n = 21$ ) si era menor (Figura 12), los cuatro individuos en los que anti-CD5 producía apoptosis no se incluyeron en esta clasificación.

Puesto que los datos de viabilidad se obtuvieron con un anticuerpo conjugado con biotina (UCHT-2 biotinilado), se quiso confirmar si podía tratarse de un artefacto debido a la conjugación. Cuando se empleó el mismo clon UCHT-2 sin biotina los resultados fueron comparables. También se utilizó otro clon, el CD5-5D7 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), obteniendo la misma respuesta que con los dos anteriores (Figura 13).





**Figura 12.- Efecto del anti-CD5 en la viabilidad de los LB de LLC-B.** Se cultivaron LB de 44 muestras de LLC-B en presencia o ausencia de anti-CD5 y se midió la viabilidad mediante anexina V/IP a las 120 h de cultivo. El gráfico representa el valor medio  $\pm$  DE del incremento de viabilidad (% viabilidad en presencia de anti-CD5 - % viabilidad en medio de cultivo) de los dos grupos de respuesta a la estimulación vía CD5. n = número de muestras.  $p < 0,0001$  según el test de Mann-Whitney.



**Figura 13.- Viabilidad mediada por distintos anticuerpos anti-CD5.** Se cultivaron LB de 5 muestras de LLC-B en presencia y ausencia de distintos anticuerpos anti-CD5. Se midió la viabilidad por anexina V/IP a las 120 h de cultivo. Los gráficos representan el valor medio  $\pm$  DE del porcentaje de viabilidad en cada una de las condiciones experimentales. (a) Anti-CD5 proporciona viabilidad en 2 muestras, (b) anti-CD5 no proporciona viabilidad en 3 muestras.

### La respuesta frente a anti-CD5 se correlaciona con la respuesta frente a anti-IgM

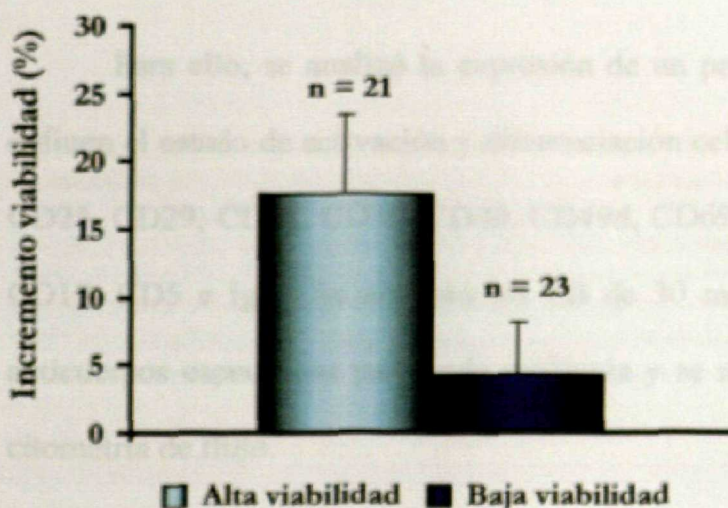
Los pacientes de LLC-B se pueden dividir en dos grupos según el desarrollo de la enfermedad. Recientemente, se han descrito diferencias en la respuesta frente a la estimulación vía BCR entre estos dos grupos, encontrando que el grupo de peor pronóstico responde mejor a señales iniciadas vía el receptor de antígeno<sup>63,71</sup>. Dado que



en el experimento anterior se habían observado dos grupos de respuesta a anti-CD5, se decidió estudiar si éstos podían correlacionarse con la respuesta a anti-IgM y, a su vez, si ambas respuestas podían relacionarse con los grupos de buen y mal pronóstico.

Ya que en experimentos previos se había observado un incremento en viabilidad cuando se cultivaba con anti-IgM 0,1 µg/ml, se midió la viabilidad por anexina V FITC/IP en presencia o ausencia de anti-IgM de las mismas 44 muestras utilizadas en el ensayo con anti-CD5. Los pacientes se dividieron en dos grupos según la respuesta a anti-IgM, utilizando como punto de corte la mediana del incremento de viabilidad (10%). Se denominó grupo de alta viabilidad a aquellas muestras con un incremento mayor o igual al 10% (n = 21) y de baja viabilidad a las que presentaban un incremento menor del 10% (n = 23) (Figura 14).

Posteriormente se confirmó que existía una correlación positiva ( $r = 0,601$ ;  $p < 0,0001$ ) entre ambos estímulos (Figura 15). Esto parecía indicar que los dos grupos de respuesta a anti-CD5 podrían coincidir con los grupos de pacientes definidos según su pronóstico.



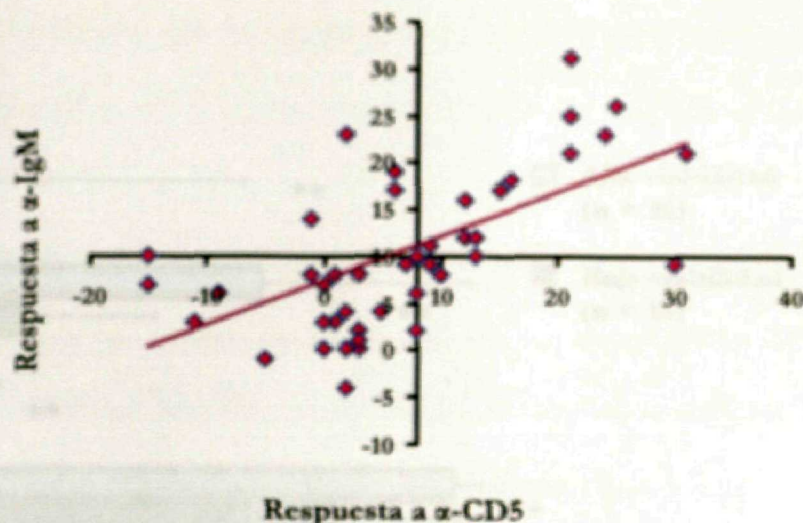
**Figura 14.- Respuesta de LB de LLC-B frente a anti-IgM.** Se cultivaron LB de 44 muestras de LLC-B en presencia o ausencia de anti-IgM 0,1 µg/ml y se midió la viabilidad mediante anexina V/IP a las 120 h de cultivo. El gráfico representa el valor medio  $\pm$  DE del incremento de viabilidad (% viabilidad en presencia de anti-IgM - % viabilidad en medio de cultivo) de los dos grupos de respuesta a la estimulación vía BCR.

n = número de muestras

$p < 0,0001$  según el test de la t de Student.



**Figura 15.-** Correlación entre respuesta frente a anti-IgM y frente a anti-CD5. Se cultivaron los LB de 44 muestras de LLC-B en presencia o ausencia de anti-CD5 o anti-IgM 0,1 µg/ml. Se midió la viabilidad por anexina V/PI a las 120 h de cultivo y se halló el coeficiente de correlación mediante el test paramétrico de Pearson. Correlación = 0,601;  $p < 0,0001$

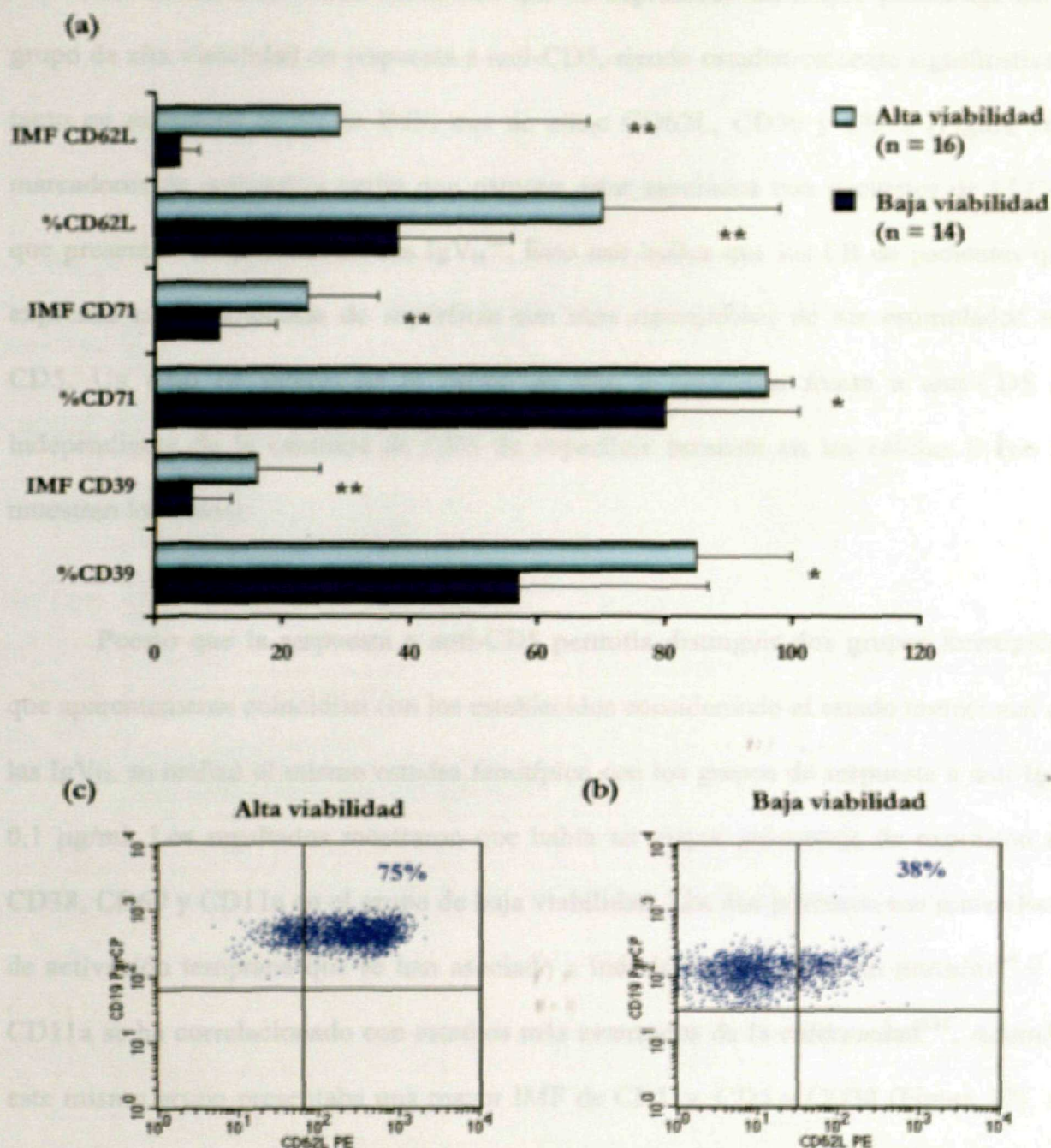


***Los grupos de respuesta a anti-CD5 difieren en sus marcadores de superficie***

Los resultados previos indicaban que algunos pacientes de LLC-B eran capaces de responder a estímulos como anti-CD5 y anti-IgM 0,1 µg/ml con mayor facilidad que otros. Se ha descrito que en LLC-B pueden distinguirse dos grupos de pacientes en función de su fenotipo de activación<sup>66</sup>, aquéllos con un fenotipo característico de células que han sido activadas recientemente y otros que presentan marcadores de activación tardía. Por tanto, era posible que el fenotipo de activación de los LB del paciente estuviera relacionado con los grupos de respuesta observados en este estudio.

Para ello, se analizó la expresión de un panel de marcadores de superficie que definen el estado de activación y diferenciación celular: CD11a, CD11b, CD11c, CD23, CD25, CD29, CD38, CD39, CD40, CD49d, CD69 y CD71; además de la expresión de CD19, CD5 e IgM. Se aislaron los LB de 30 muestras de LLC-B, se marcaron con anticuerpos específicos para cada molécula y se midió el porcentaje de expresión por citometría de flujo.





**Figura 16.- Expresión diferencial de marcadores de superficie según la respuesta frente a anti-CD5.** Se marcaron los LB de 30 muestras de LLC-B mediante marcaje directo con anticuerpos específicos y se analizó la expresión de cada marcador por citometría de flujo. (a) El gráfico representa el valor medio  $\pm$  DE del porcentaje y de la IMF de los marcadores diferenciales entre los dos grupos según la respuesta frente a anti-CD5. Debajo se muestra un caso representativo del porcentaje expresión de CD62L en LB (células CD19<sup>+</sup>) de un individuo de alta (b) y de baja (c) viabilidad.

IMF: Intensidad media de fluorescencia; n = número de muestras

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,005$ , aplicando el test de la t-Student o el test de Mann-Whitney, según el caso.

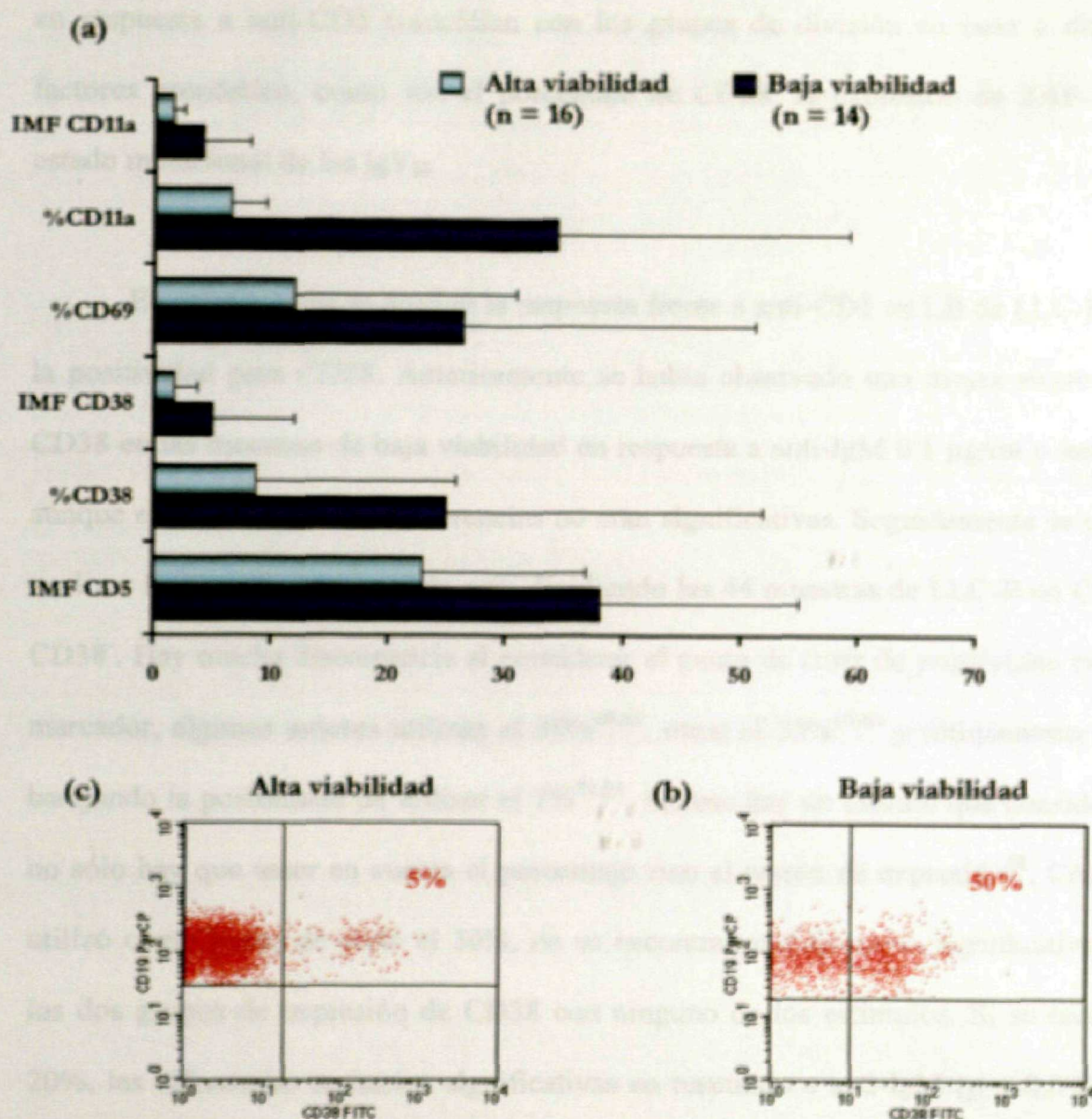


Se encontraron varias moléculas que se expresaban en mayor porcentaje en el grupo de alta viabilidad en respuesta a anti-CD5, siendo estadísticamente significativas, tanto en expresión como en IMF, tres de ellas: CD62L, CD39 y CD71 (Figura 16), marcadores de activación tardía que parecen estar asociados con pacientes de LLC-B que presentan mutaciones en sus IgV<sub>H</sub><sup>66</sup>. Esto nos indica que los LB de pacientes que expresan estas moléculas de superficie son más susceptibles de ser estimulados vía CD5. Un dato de interés es el hecho de que la respuesta frente a anti-CD5 es independiente de la cantidad de CD5 de superficie presente en las células B (no se muestran los datos).

Puesto que la respuesta a anti-CD5 permitía distinguir dos grupos fenotípicos que aparentemente coincidían con los establecidos considerando el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>, se realizó el mismo estudio fenotípico con los grupos de respuesta a anti-IgM 0,1 µg/ml. Los resultados mostraron que había un mayor porcentaje de expresión de CD38, CD69 y CD11a en el grupo de baja viabilidad. Los dos primeros son marcadores de activación temprana que se han asociado a individuos con IgV<sub>H</sub> no mutadas<sup>66</sup> y el CD11a se ha correlacionado con estadios más avanzados de la enfermedad<sup>124</sup>. Además, este mismo grupo presentaba una mayor IMF de CD11a, CD5 y CD38 (Figura 17). Al igual que ocurría con anti-CD5, la respuesta vía BCR no dependía de la expresión de IgM de superficie, lo que coincide con lo descrito previamente<sup>71</sup>. Además, la expresión de este último marcador no se correlacionaba con la expresión de CD5, esto es, la expresión de uno es independiente de la del otro (no se muestran los datos). Por otra parte, si se analizaban los marcadores uno a uno, se observaba que los de mayor expresión en el grupo de baja viabilidad frente a anti-IgM coincidían con los de mayor expresión en el grupo de baja viabilidad frente a anti-CD5, y viceversa, aunque las



diferencias no alcanzasen la significación estadística. Esto confirmaba una vez más que los grupos que se distinguían en función de la respuesta a anti-CD5 se correspondían con los observados en la respuesta frente a anti-IgM.



**Figura 17.- Expresión diferencial de marcadores de superficie según la respuesta frente a anti-IgM.**

Se marcaron los LB de 29 muestras de LLC-B mediante marcaje directo con anticuerpos específicos y se analizó la expresión de cada marcador por citometría de flujo. (a) El gráfico representa el valor medio  $\pm$  DE del porcentaje y de la IMF de los marcadores diferenciales entre los dos grupos según la respuesta frente a anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml. Debajo se muestra un caso representativo del porcentaje de expresión de CD38 en LB (células CD19<sup>+</sup>) de un individuo de baja (b) y de alta (c) viabilidad.

IMF: Intensidad media de fluorescencia; n = número de muestras

En todos los marcadores el valor de  $p$  era  $< 0,05$ , aplicando el test de la t-Student o el test de Mann-Whitney, según el caso.

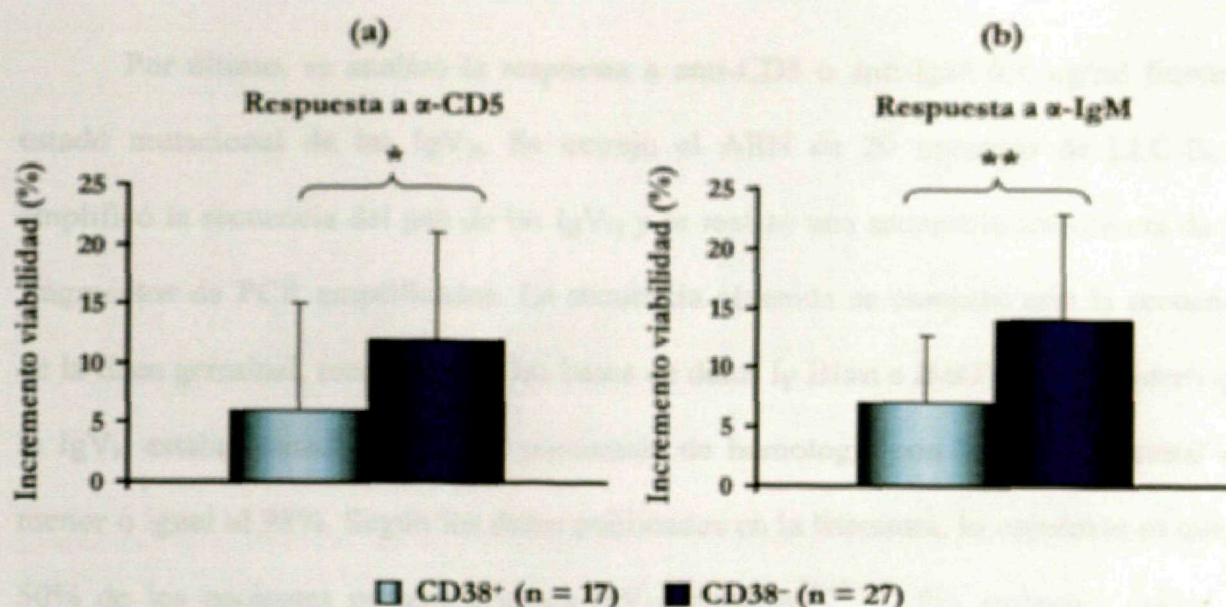


*La respuesta frente a anti-CD5 se correlaciona con la expresión de CD38 y el estado mutacional de los genes de las IgV<sub>H</sub>, pero no con la expresión de ZAP-70*

La siguiente cuestión que se planteó fue analizar si las diferencias de viabilidad en respuesta a anti-CD5 coincidían con los grupos de división en base a diferentes factores pronóstico, como son el porcentaje de CD38, la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>.

En primer lugar se analizó la respuesta frente a anti-CD5 en LB de LLC-B según la positividad para CD38. Anteriormente se había observado una mayor expresión de CD38 en las muestras de baja viabilidad en respuesta a anti-IgM 0,1 µg/ml o anti-CD5, aunque en estas últimas las diferencias no eran significativas. Seguidamente se propuso analizar los grupos de respuesta pero dividiendo las 44 muestras de LLC-B en CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>. Hay mucha discrepancia al considerar el punto de corte de positividad para este marcador, algunos autores utilizan el 30%<sup>48,61</sup>, otros el 20%<sup>60,62</sup> y últimamente se está barajando la posibilidad de utilizar el 7%<sup>53,55</sup>, incluso hay un estudio que considera que no sólo hay que tener en cuenta el porcentaje sino el patrón de expresión<sup>58</sup>. Cuando se utilizó como punto de corte el 30%, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de expresión de CD38 con ninguno de los estímulos. Si se recurría al 20%, las diferencias se hacían significativas en respuesta a anti-IgM ( $p = 0,045$ ), pero no en respuesta a anti-CD5 ( $p = 0,084$ ). En cambio, las diferencias eran estadísticamente significativas entre los grupos de respuesta a ambos estímulos al utilizar como punto de corte el 7% (Figura 18), habiendo una mayor respuesta en las muestras CD38<sup>-</sup>, lo que coincidía con resultados previos de este trabajo.





**Figura 18.- Respuesta a anti-CD5 o anti-IgM según la positividad para CD38.** Se marcaron los LB de 44 muestras de LLC-B con un anti-CD38 FITC y se analizó la expresión por citometría de flujo. Se consideró que la muestra era CD38<sup>+</sup> cuando el porcentaje de células positivas para CD38 era mayor o igual al 7%. Seguidamente, se cultivaron los LB en presencia o ausencia de anti-CD5 o anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml y se cuantificó la viabilidad celular a las 48 h de cultivo mediante anexina V/IP. Los gráficos representan el valor medio  $\pm$  DE del incremento de viabilidad según la respuesta a anti-CD5 (a) o anti-IgM (b).

n = número de muestras

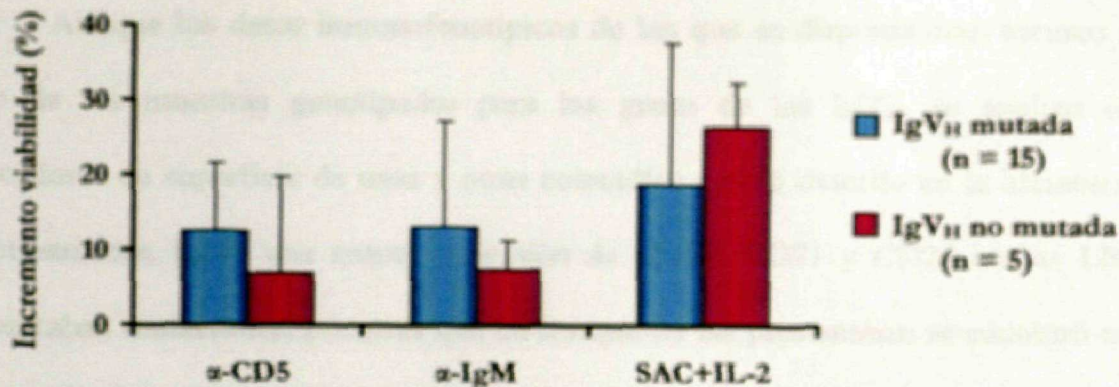
\*p = 0,044, \*\*p = 0,013, según el test de Mann-Whitney

En segundo lugar, se estudiaron los grupos de respuesta a anti-CD5 o anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml respecto a la expresión de ZAP-70. Para ello, se cuantificó la expresión de esta molécula en 17 pacientes de LLC-B mediante marcaje indirecto con un anticuerpo anti-ZAP-70. Paralelamente, se cultivaron las células con o sin anti-CD5 o anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml. Se consideró que una muestra era ZAP-70<sup>+</sup> cuando el porcentaje de células positivas para el marcador era mayor o igual al 20%<sup>65</sup>. Se encontró positividad en tan sólo 5 de los 17 casos analizados. No se encontraron diferencias significativas en el grado de respuesta a ambos estímulos de las muestras ZAP-70<sup>+</sup> respecto a las ZAP-70<sup>-</sup>, posiblemente debido al bajo número de casos positivos encontrados en este estudio (no se muestran los datos).

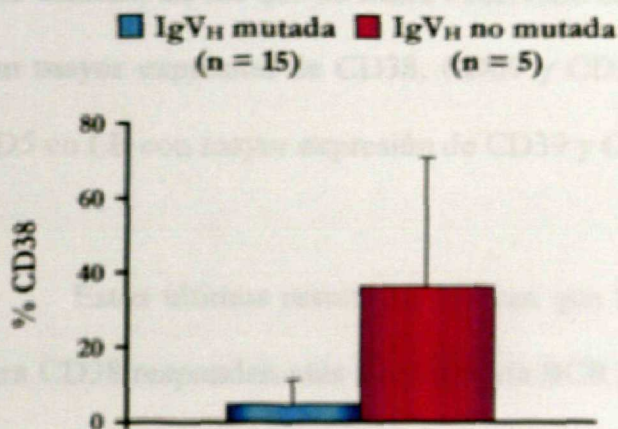


Por último, se analizó la respuesta a anti-CD5 o anti-IgM 0,1 µg/ml frente al estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>. Se extrajo el ARN de 20 muestras de LLC-B, se amplificó la secuencia del gen de las IgV<sub>H</sub> y se realizó una secuenciación directa de los fragmentos de PCR amplificados. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de la línea germinal, recurriendo a las bases de datos Ig Blast e IMGT. Se consideró que la IgV<sub>H</sub> estaba mutada cuando el porcentaje de homología con la línea germinal era menor o igual al 98%. Según los datos publicados en la literatura, lo esperable es que el 50% de los pacientes presenten genes IgV<sub>H</sub> mutados<sup>47,48,130</sup>. Sin embargo, de las 20 muestras analizadas, tan sólo 5 resultaron ser mutadas. Esto indicaba que se trataba de una muestra pequeña o que el grupo de pacientes seleccionado estaba sesgado. Aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas, se observó una mayor respuesta a ambos estímulos en las muestras con IgV<sub>H</sub> mutadas (Figura 19), lo que parece indicar una mayor susceptibilidad de estas muestras de LLC-B a responder frente a anti-CD5 o anti-IgM en las condiciones de trabajo empleadas. Por el contrario, es de destacar que las muestras no mutadas respondían mejor frente a SAC + IL-2. Además, en concordancia con la literatura<sup>48</sup>, las muestras que presentaban mutaciones en las IgV<sub>H</sub> presentaban un porcentaje de CD38 menor que aquéllas que no las presentaban (Figura 20). Un dato importante es el hecho de que las 2 muestras con mayor incremento en PTyr a los 10' cuando se estimulaba con anti-IgM 10 µg/ml (incremento en IMF = 43) pertenecían al grupo de las IgV<sub>H</sub> no mutadas, mientras que las 4 muestras que menos respondían (incremento en IMF = 16) estaban dentro de las IgV<sub>H</sub> mutadas. Sin embargo, ninguna de las 2 muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas respondían a anti-IgM 0,1 µg/ml (incremento en viabilidad = 0%). Esto indica que los pacientes de LLC-B no responden de igual manera frente a una u otra concentración de anti-IgM.

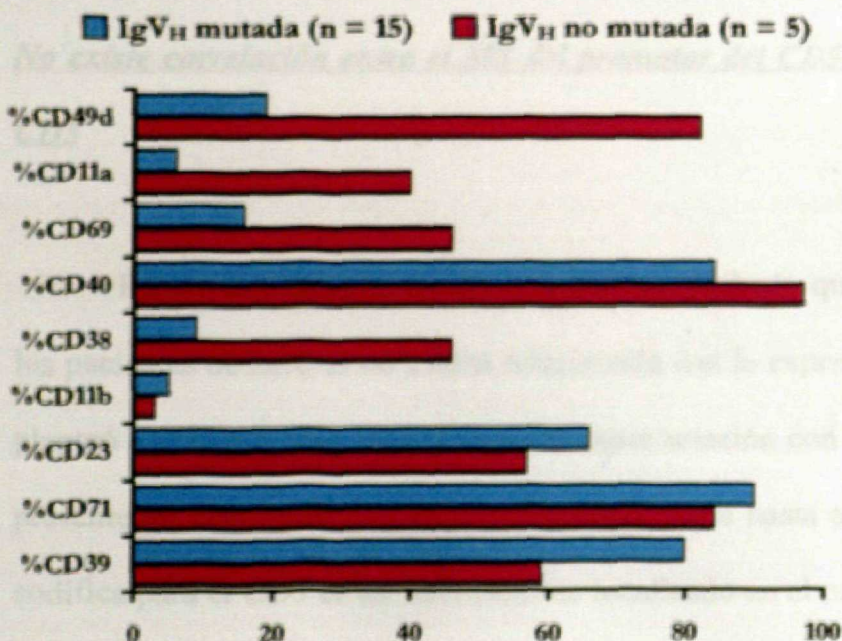




**Figura 19.- Respuesta frente a los diferentes estímulos en pacientes de LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutadas y no mutadas.** Se analizó el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub> en 20 pacientes de LLC-B. Se cultivaron los LB en presencia o ausencia de anti-CD5, anti-IgM 0,1 µg/ml o SAC + IL-2 y se cuantificó la viabilidad por anexina V/IP. El gráfico representa el valor medio ± DE del incremento de viabilidad según la respuesta a anti-IgM, anti-CD5 o SAC + IL-2.  
n = número de muestras



**Figura 20.- Expresión de CD38 en pacientes de LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutadas y no mutadas.** Se analizó el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub> en 20 pacientes de LLC-B. Se marcaron los LB con un anti-CD38 y se analizó su expresión por citometría de flujo. El gráfico representa el valor medio ± DE del porcentaje de CD38 en LB de pacientes de LLC-B que presentan o no mutaciones en los genes IgV<sub>H</sub>.  
n = número de muestras



**Figura 21.- Expresión diferencial de marcadores de superficie según el estado mutacional de los genes de las IgV<sub>H</sub>.** Se marcaron los LB de 8 casos de LLC-B, previamente genotipados para las IgV<sub>H</sub>, mediante marcaje directo con anticuerpos específicos, y se analizó la expresión de cada marcador por citometría de flujo. (a) El gráfico representa el valor medio de la IMF de los marcadores diferenciales entre los dos grupos según el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>.  
n = número de muestras



Aunque los datos inmunofenotípicos de los que se disponía eran escasos en el caso de las muestras genotipadas para los genes de las IgV<sub>H</sub>, se analizó si los marcadores de superficie de unas y otras coincidían con lo descrito en la literatura<sup>66,68</sup>. Efectivamente, había una mayor expresión de CD39, CD71 y CD23 en los LB que presentaban mutaciones, mientras que en los que no las presentaban se encontró mayor porcentaje de CD38, CD40 y CD69. Además, también había mayor porcentaje de CD11b, asociado con estadios tempranos de la enfermedad, en pacientes con IgV<sub>H</sub> mutadas, y de CD11a y CD49d, relacionados con estadios más avanzados<sup>124</sup>, en individuos con IgV<sub>H</sub> no mutadas (Figura 21). Esto concuerda con resultados previos de este estudio, en los que se había observado una menor respuesta frente anti-IgM en LB con mayor expresión de CD38, CD69 y CD11a, y una mayor respuesta frente a anti-CD5 en LB con mayor expresión de CD39 y CD71.

Estos últimos resultados indican que las LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutadas y negativas para CD38 responden más a señales vía BCR y CD5 en nuestras condiciones de trabajo, lo que está asociado con un pronóstico favorable de la enfermedad.

#### **No existe correlación entre el MS del promotor del CD5 y la respuesta frente a anti-CD5**

Puesto que anteriormente se había comprobado que la respuesta a anti-CD5 en los pacientes de LLC-B no estaba relacionada con la expresión en superficie de CD5, se planteó analizar si esta respuesta podía tener relación con algún polimorfismo genético presente en esta molécula. El único polimorfismo hasta ahora conocido en el gen que codifica para el CD5 es un microsatélite localizado en el promotor<sup>86,87</sup>. Para este estudio



se utilizó el ADN de 134 pacientes con LLC-B y, como control, el ADN de 102 individuos sanos y 47 pacientes con LCM.

El análisis de los resultados de las muestras de LLC-B mostró la presencia de alelos comprendidos entre 11 y 20 repeticiones CA. Cuando se examinó la distribución alélica de este polimorfismo, no se encontraron diferencias entre pacientes de LLC-B y controles. Sin embargo, al comparar las frecuencias de cada uno de los alelos, se observó que el alelo de 19 CA estaba más representado en LLC-B que en controles (Tabla 6 y Figura 22a). Por otra parte, la distribución alélica de LCM y controles era diferente de manera estadísticamente significativa ( $p_c = 0,008$ , aplicando la corrección de Bonferroni). Además, se encontró que el alelo de 17 repeticiones CA estaba menos representado en individuos con LCM que en sanos y LLC-B, y el alelo de 18 CA aparecía mayor número de veces en LCM comparado con controles y LLC-B.

El análisis de los genotipos mostró que el más representado en las tres poblaciones era el 18/18. Además, el 17% de los pacientes de LLC-B y el 24% de los pacientes de LCM presentaban el genotipo 19/18, en comparación con el 6% de los individuos sanos ( $p = 0,013$ ; OR = 3,14; 95% CI = 1,22-8,07;  $p = 0,002$ ; OR = 4,89; 95% CI = 1,68-14,20, respectivamente); mientras que el genotipo 18/17 estaba menos representado en LCM (9%) que en sanos (24%) ( $p = 0,029$ ; OR = 0,30; 95% CI = 0,10-0,93) (Figura 22b). No había diferencias estadísticamente significativas en el resto de los genotipos analizados, sin embargo, era de destacar que el genotipo 19/19 sólo aparecía en LLC-B y el alelo de 20 CA en LLC-B y LCM, pero nunca en sanos.



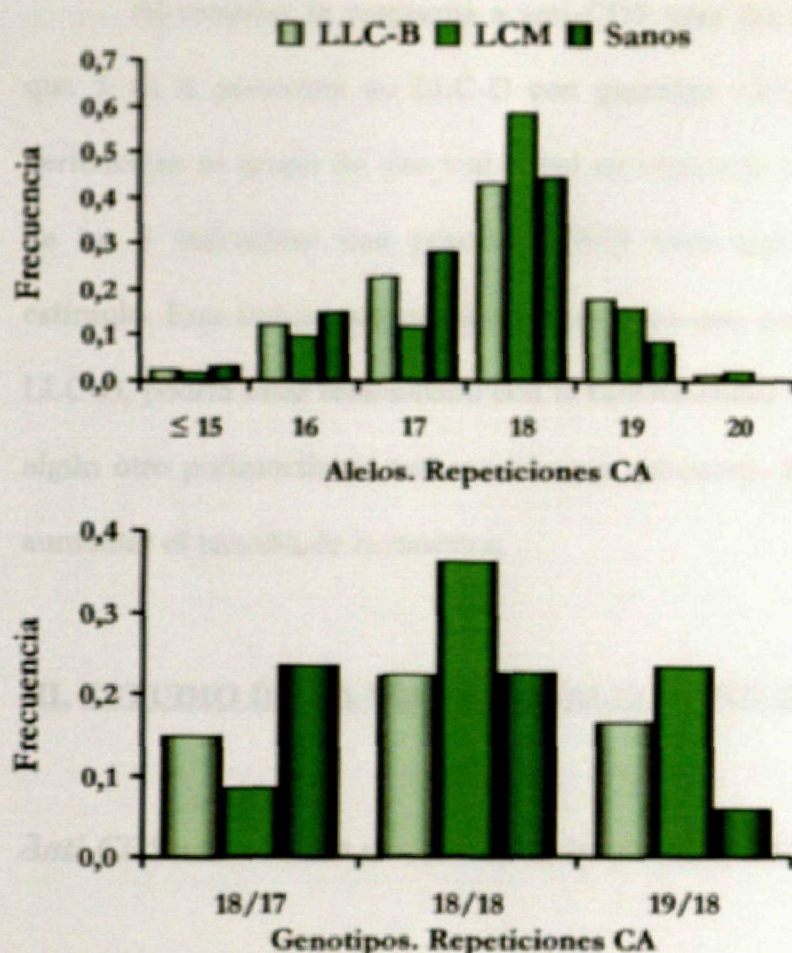


Figura 22.- Distribución alélica y genotípica del MS de CD5. Se extrajo el ADN de 137 muestras de LLC-B, 47 de LCM y 102 de individuos sanos, se amplificó el MS de CD5 por PCR y el producto se analizó en geles de acrilamida al 6%. Los gráficos muestran la distribución de los distintos alelos en las tres poblaciones (a) y los genotipos más representados (b).

Tabla 6.- Frecuencias alélicas del MS del promotor del CD5.

Alelo	Controles (n = 204)	LLC-B (n = 260)	LCM (n = 56)	$p^1$ OR (IC 95%)	$p^2$ OR (IC 95%)	$p^3$ OR (IC 95%)
15	0,019	0,022	0,013	n.s.	n.s.	n.s.
16	0,150	0,123	0,096	n.s.	n.s.	n.s.
17	0,286	0,228	0,117	n.s.	0,002 0,34 (0,17-0,69)	0,021 0,45 (0,23-0,90)
18	0,442	0,433	0,585	n.s.	0,026 1,75 (1,07-2,87)	0,011 1,85 (1,15-2,98)
19	0,087	0,179	0,160	0,005 2,26 (1,27-4,01)	n.s.	n.s.
20	0,000	0,011	0,021	n.s.	n.s.	n.s.

n = número de alelos

<sup>1</sup>Controles comparados con pacientes de LLC-B.

<sup>2</sup>Controles comparados con pacientes de LCM.

<sup>3</sup>Pacientes de LLC-B comparados con pacientes de LCM

n.s. = no significativo



Al estudiar la respuesta a anti-CD5 para los diferentes genotipos, se encontró que 5 de 8 pacientes de LLC-B con genotipo 18/18 y 3 de 6 con genotipo 17/17 pertenecían al grupo de alta viabilidad en respuesta a anti-CD5, mientras que ninguno de los 3 individuos con genotipo 19/19 tenía una respuesta positiva frente a este estímulo. Esto indica que este último genotipo que, por otra parte, es característico de la LLC-B, podría estar relacionado con la funcionalidad del CD5 o podría ser marcador de algún otro polimorfismo cercano aún por descubrir. Para comprobarlo, sería necesario aumentar el tamaño de la muestra.

### **III. ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL CD5**

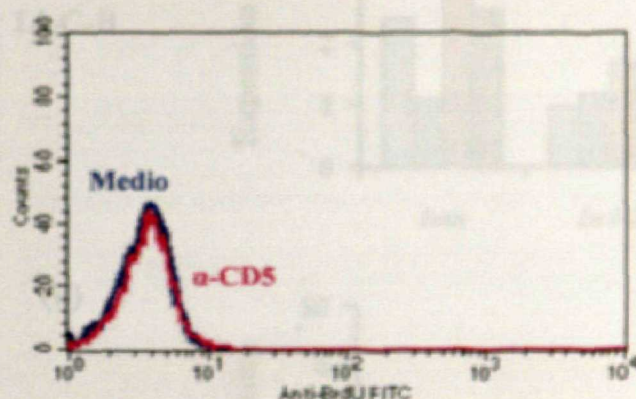
#### ***Anti-CD5 no induce la proliferación de los LB de LLC-B***

Una vez comprobado que anti-CD5 era capaz de proporcionar viabilidad a los LB de casi el 50% de las muestras de LLC-B, se propuso conocer qué vías estaban implicadas en dicho mantenimiento de la viabilidad. Como en el caso de anti-IgM, se comprobó si la viabilidad mediada por anti-CD5 era debida a proliferación. Para ello, se cultivaron los LB de 6 individuos con LLC-B en presencia o ausencia del anticuerpo. Seguidamente se analizó el porcentaje de células proliferantes mediante incorporación de BrdU y posterior marcaje con un anticuerpo anti-BrdU FITC. Como controles se utilizaron 3 muestras de amígdalas.

Anti-CD5 no induce proliferación ni en LB de LLC-B (Figura 23) ni de amígdala, indicando que el incremento de viabilidad observado en las células



neoplásicas en respuesta a este anticuerpo se debe a un mantenimiento de la misma y no a un efecto de la proliferación.

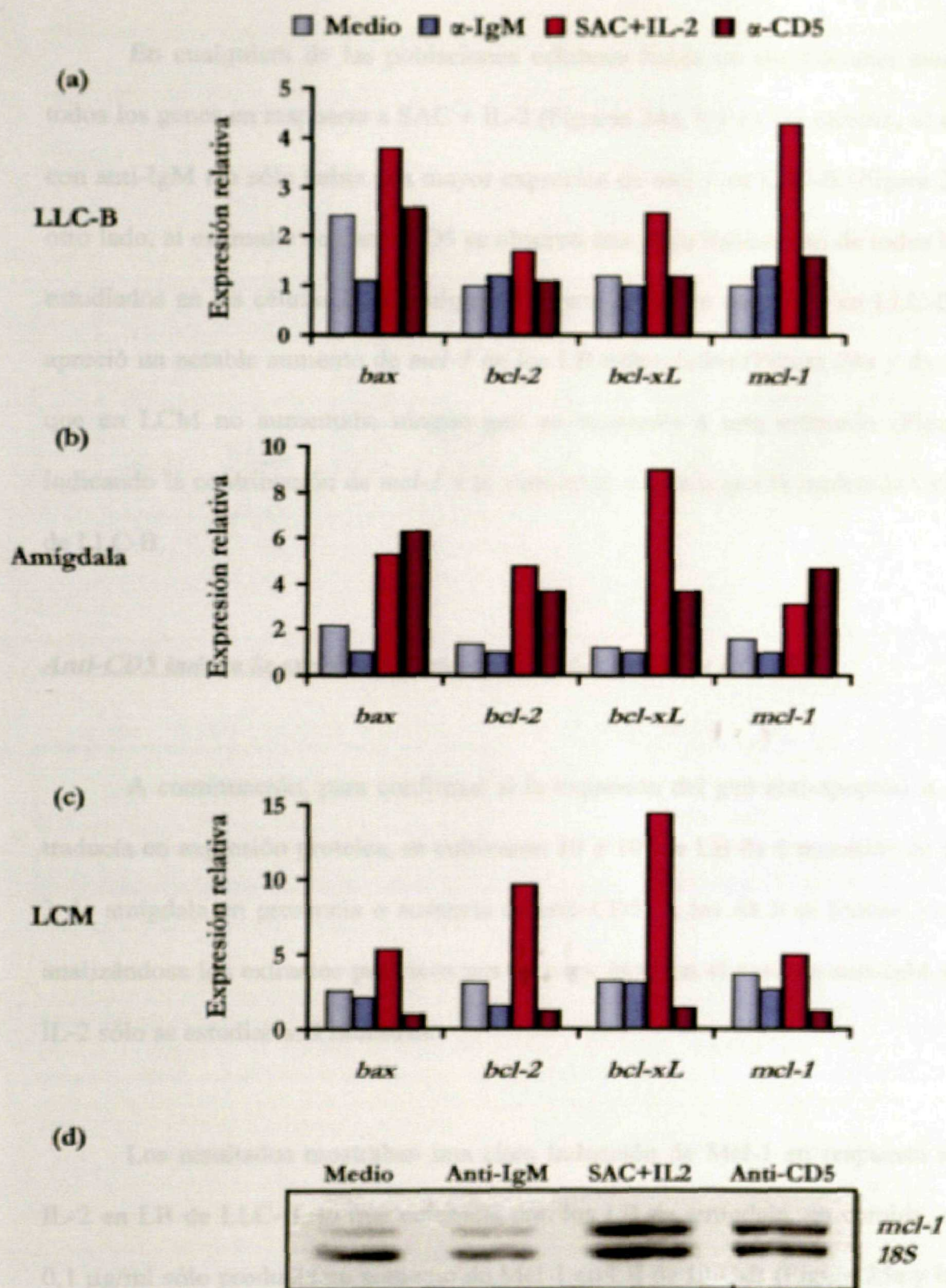


**Figura 23.- Estudio de la proliferación de LB de LLC-B en respuesta a anti-CD5.** Se midió la tasa de proliferación en 6 muestras de LLC-B mediante incorporación de BrdU y posterior marcaje con un anti-BrdU FITC. Se muestra un caso representativo.

### ***Anti-CD5 induce la expresión génica de *mcl-1* en LB de LLC-B***

Se ha descrito que la estimulación de LB de LLC-B con anti-CD5 modula la expresión de genes de la familia de *bcl-2*<sup>116,117</sup>. Por tanto, se quiso comprobar si la viabilidad inducida por anti-CD5 podía también estar mediada por algún gen de esta familia. Dado el desconocimiento que existe acerca de la modulación de estos genes por señales positivas mediadas por CD5, se utilizaron como estímulos control anti-IgM 0,1 µg/ml o SAC/IL-2. Para ello se estudió por RT-PCR la expresión génica a las 48 h de cuatro de estos genes, *bax*, como pro-apoptótico, y *bcl-x<sub>L</sub>*, *mcl-1* y *bcl-2*, como anti-apoptóticos. Se determinó la expresión relativa normalizando con un gen de expresión constante, el *ARN18S*. En este estudio se utilizaron LB de 3 muestras de LLC-B, 2 de LCM y 2 de amígdala.





**Figura 24.-** Expresión de genes de la familia de *bcl-2* en respuesta a los diferentes estímulos. Se cultivaron LB de 3 muestras de LLC-B, 2 de LCM y 2 de amígdalas en presencia o ausencia de anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml, anti-CD5 o SAC + IL-2. Se extrajo el ARN a las 48 h de cultivo y se amplificaron distintos genes de la familia de *bcl-2* por RT-PCR. En la figura se muestra el valor medio de la expresión génica, referida al gen *ARN18S* de expresión constante, de cada uno de los genes en LB de LLC-B (a), amígdala (b) y LCM (c). (d) Gel de agarosa mostrando el fragmento amplificado de *mcl-1* en LB de un caso representativo de LLC-B.



En cualquiera de las poblaciones celulares había un considerable aumento de todos los genes en respuesta a SAC + IL-2 (Figuras 24a, b y c). En cambio, al estimular con anti-IgM tan sólo había una mayor expresión de *mcl-1* en LLC-B (Figura 24a). Por otro lado, al estimular con anti-CD5 se observó un claro incremento de todos los genes estudiados en las células B de amígdala (Figura 24b). Sin embargo, en LLC-B sólo se apreció un notable aumento de *mcl-1* en los LB estimulados (Figura 24a y d), mientras que en LCM no aumentaba ningún gen en respuesta a este estímulo (Figura 24c), indicando la contribución de *mcl-1* a la viabilidad mediada por la molécula CD5 en LB de LLC-B.

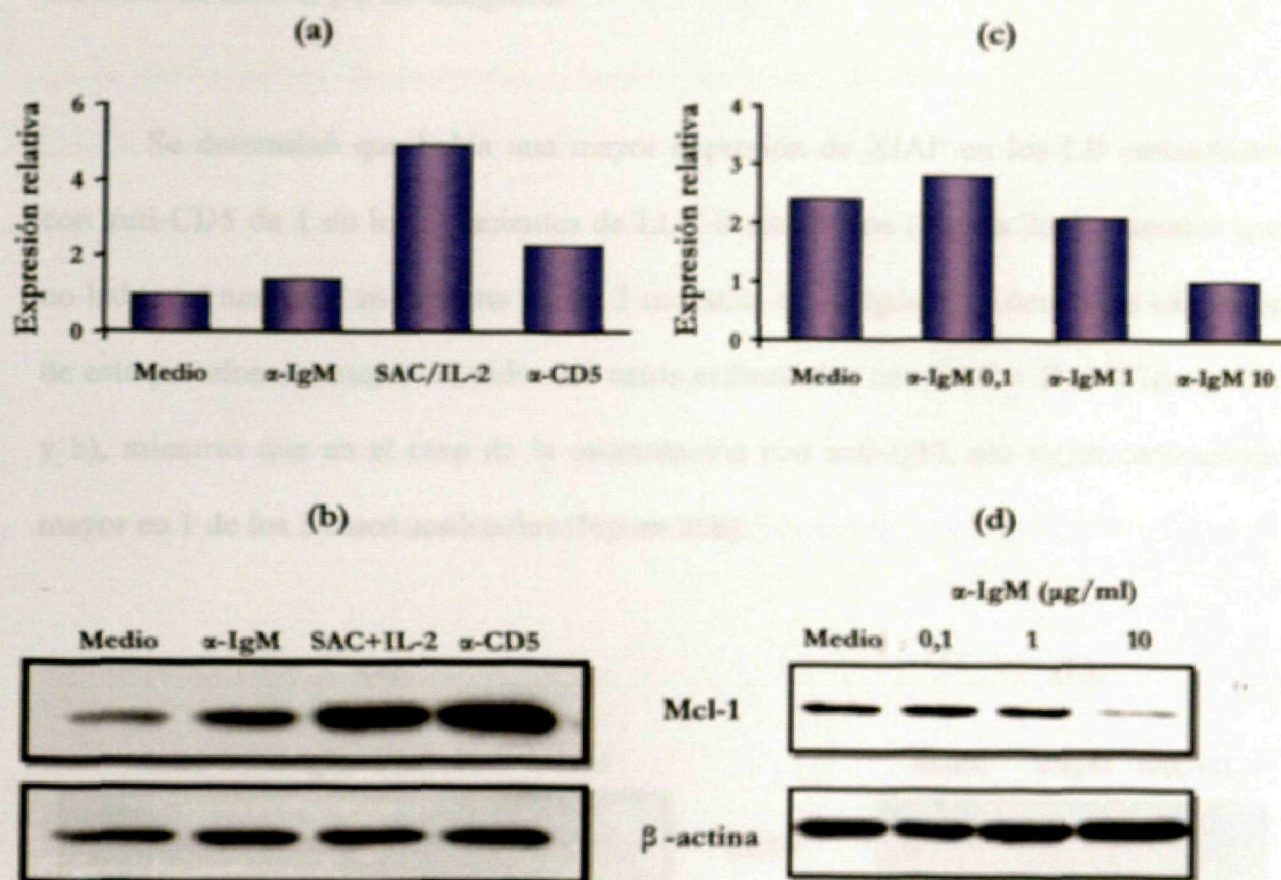
#### **Anti-CD5 induce la expresión proteica de Mcl-1 en LB de LLC-B**

A continuación, para confirmar si la expresión del gen anti-apoptótico *mcl-1* se traducía en expresión proteica, se cultivaron  $10 \times 10^6$  de LB de 6 muestras de LLC-B y 3 de amígdala en presencia o ausencia de anti-CD5. A las 48 h se lisaron las células, analizándose los extractos proteicos por *western blot*. En el caso de anti-IgM y SAC + IL-2 sólo se estudiaron 3 muestras.

Los resultados mostraban una clara inducción de Mcl-1 en respuesta a SAC + IL-2 en LB de LLC-B, lo que coincidía con los LB de amígdala, en cambio, anti-IgM 0,1  $\mu\text{g/ml}$  sólo producía un aumento de Mcl-1 en LB de LLC-B (Figura 25a y b). Como se puede observar en las figuras 25c y d, la expresión de Mcl-1 en respuesta a anti-IgM disminuía al incrementar la concentración del anticuerpo, lo que concuerda con el hecho de que a altas concentraciones de este anticuerpo las células B de LLC-B sufran



apoptosis. Sin embargo, al estimular con anti-CD5, tan sólo se observó una mayor expresión de Mcl-1 en LB de LLC-B, siendo mayor en 5 de las 6 muestras analizadas (Figura 25a y b).



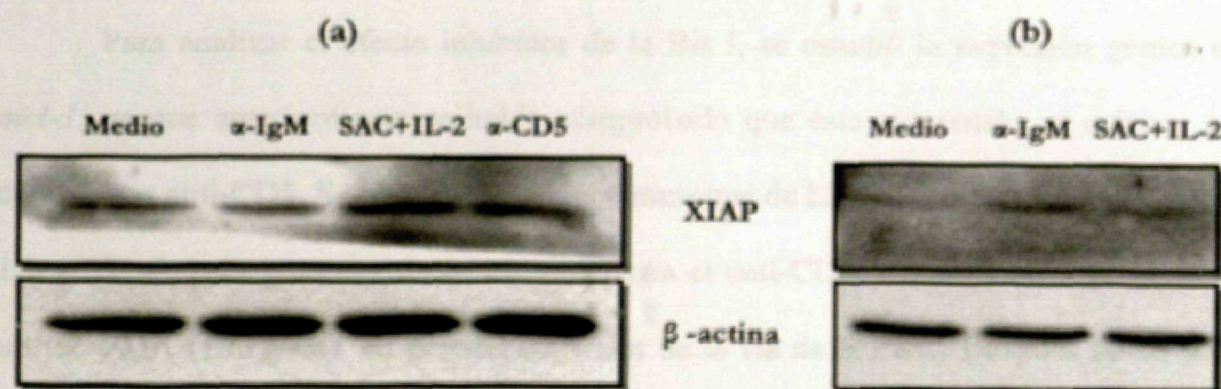
**Figura 25.-** Expresión proteica de Mcl-1 en LB de LLC-B en respuesta los diferentes estímulos. Se cultivaron LB de 6 pacientes de LLC-B en presencia o ausencia de anti-IgM 0,1  $\mu$ g/ml, SAC + IL-2 o anti-CD5. Se lisaron las células a las 48 h de cultivo y se estudiaron los extractos proteicos por *western blot*. A la izquierda se muestra la expresión proteica de Mcl-1, referida a la  $\beta$ -actina de expresión constante, en los LB de LLC-B cultivados con los distintos estímulos (a) y debajo una autorradiografía de un caso representativo (b). A la derecha, un ejemplo de dicha expresión con diferentes concentraciones de anti-IgM (c) y debajo la autorradiografía (d).

Se sabe que otras proteínas anti-apoptóticas contribuyen al mantenimiento de la viabilidad en las células B de LLC-B, entre ellas, proteínas inhibidoras de apoptosis como XIAP. Por ello, se estudió la expresión proteica de la proteína inhibidora de apoptosis XIAP, capaz de inhibir directamente a algunos miembros de la familia de las



caspasas<sup>131</sup>. Además, se ha descrito que su expresión disminuye cuando se inhibe la vía de la PI3-K<sup>132</sup>, crucial en la supervivencia celular mediada por el BCR, y aumenta cuando se potencia esta vía<sup>35</sup>. Con todo ello, se analizaron los extractos proteicos de 3 muestras de LLC-B y 3 de amígdalas.

Se determinó que había una mayor expresión de XIAP en los LB estimulados con anti-CD5 de 1 de los 3 pacientes de LLC-B estudiados (Figura 26a), mientras que no había tal aumento en ninguna de las 3 muestras de amígdala. Además, la expresión de esta proteína era mayor en todos los casos estimulados con SAC + IL-2 (Figuras 26a y b), mientras que en el caso de la estimulación con anti-IgM, era significativamente mayor en 1 de los 3 casos analizados (Figura 26b).



**Figura 26.- Expresión proteica de XIAP en LLC-B frente a los diferentes estímulos.** Se estimularon LB de 3 muestras de LLC-B en presencia o ausencia de anti-IgM 0,1 µg/ml, SAC + IL-2 o anti-CD5. Las células se lisaron tras 48 h de cultivo y se estudió la expresión de XIAP por *western blot*. Se muestra un caso en que la expresión, referida a la β-actina de expresión constante, es mayor con anti-CD5 (a) y otro donde es mayor con anti-IgM (b).

Con todos estos datos podemos concluir que Mcl-1 juega un importante papel en el mantenimiento de la viabilidad mediada por CD5 en los LB de LLC-B, mientras que XIAP sólo lo hace en algunos pacientes.



### ***La viabilidad proporcionada por anti-CD5 está mediada por PKC***

Se ha postulado que la PKC pudiera tener un papel en la señalización vía CD5 tanto en LT como en LB<sup>112</sup>, además, se ha comprobado que es una proteína implicada en la supervivencia de las células B de LLC-B<sup>133,134</sup>. Por tanto, se propuso estudiar si esta molécula estaba implicada en la viabilidad mediada por CD5 en los LB de LLC-B. Para ello se estudió el efecto en la viabilidad de estas células de la bisindolilmaleimida I, un inhibidor específico de varias isoformas de la PKC (PKC- $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ). Primeramente se preincubaron LB de LLC-B con Bis I a distintas concentraciones (0,1-20  $\mu$ M), para comprobar que la dosis utilizada no tuviera efectos citotóxicos. Se observó que a 1  $\mu$ M la Bis I prácticamente no aumentaba la apoptosis espontánea de las células.

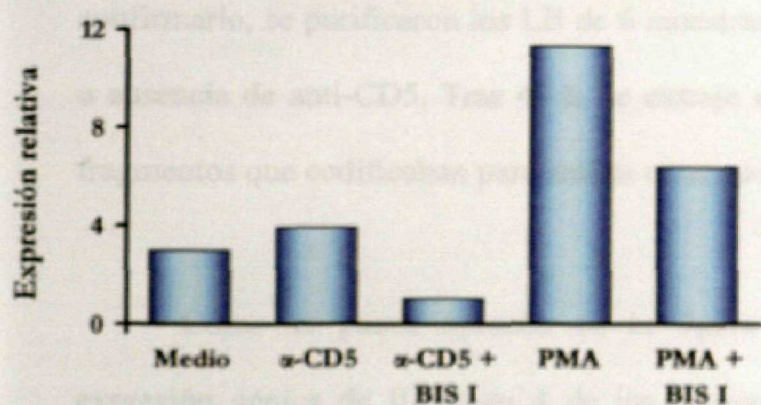
Para analizar el efecto inhibidor de la Bis I, se estudió la expresión génica de *mcl-1*, ya que anteriormente se había comprobado que ésta aumentaba al cultivar las células con anti-CD5. Se incubaron LB de 4 muestras de LLC-B con Bis I 1  $\mu$ M durante 1 h a 37° C, para posteriormente estimular con el anti-CD5. Como control positivo se utilizó PMA (10 ng/ml), un potente activador de la vía de la PKC. Después de 48 h de cultivo se extrajo el ARN y se amplificó un fragmento del gen *mcl-1* por RT-PCR.

Se observó que la PMA inducía *mcl-1* en 3 de los 4 casos analizados, inducción que era revertida al preincubar con Bis I (Figura 27). Por otro lado, el análisis de las células estimuladas con anti-CD5 mostraba una mayor expresión de *mcl-1* en 2 de las muestras estudiadas, la cual revertía con la Bis I (Figura 27). En el tercer caso la expresión no variaba ni con anti-CD5 ni con Bis I; y en el cuarto, había un descenso de

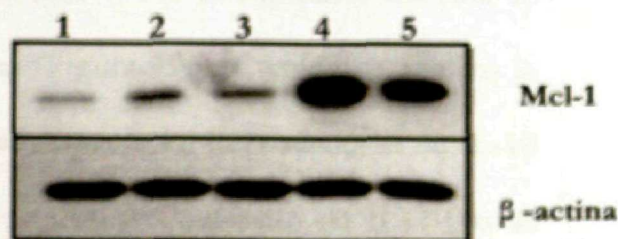
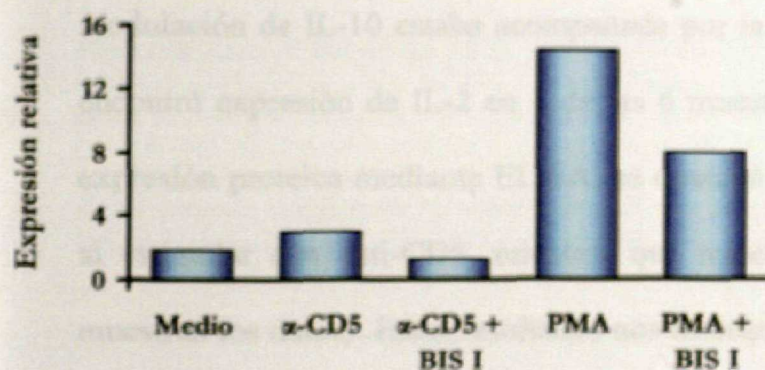


*mcl-1*, que se recuperaba con el inhibidor. En este último caso, la estimulación con PMA tenía el mismo efecto, una reducción de *mcl-1*, que revertía al incubar con Bis I.

A continuación, se confirmó la expresión proteica de Mcl-1 en las mismas condiciones. En las 3 muestras analizadas la PMA aumentaba la expresión de Mcl-1, revirtiéndose tal expresión con Bis I. En el caso de anti-CD5, ocurría lo mismo en 2 de los 3 casos (Figura 28). Esto nos confirmaba la implicación de la PKC en la señalización vía CD5.



**Figura 27.- Efecto de la inhibición de la PKC en la expresión génica de *mcl-1* inducida por anti-CD5.** Se estimularon LB de 4 muestras de LLC-B con anti-CD5 o PMA en presencia o ausencia de Bis I. Se extrajo el ARN a las 48 h de cultivo y se estudió la expresión génica de Mcl-1 por RT-PCR. El gráfico representa el valor medio la expresión génica relativa de Mcl-1, referida al gen *ARN18S* de expresión constante, de 2 muestras de LLC-B.



**Figura 28.- Efecto de la inhibición de la PKC en la expresión proteica de Mcl-1 inducida por anti-CD5.** Se estimularon LB de 3 muestras de LLC-B con anti-CD5 o PMA en presencia o ausencia de Bis I. Se lisaron las células a las 48 h de cultivo y se estudió la expresión de Mcl-1 por western blot. El gráfico representa el valor medio de la expresión proteica relativa de Mcl-1, referida a la β-actina de expresión constante, de 2 muestras de LLC-B. A la derecha se muestra un caso representativo (1. Medio, 2. anti-CD5, 3. anti-CD5 + Bis I, 4. PMA, 5. PMA + Bis I).



*Anti-CD5 induce la síntesis de IL-10, pero no de IL-2 en LB de LLC-B*

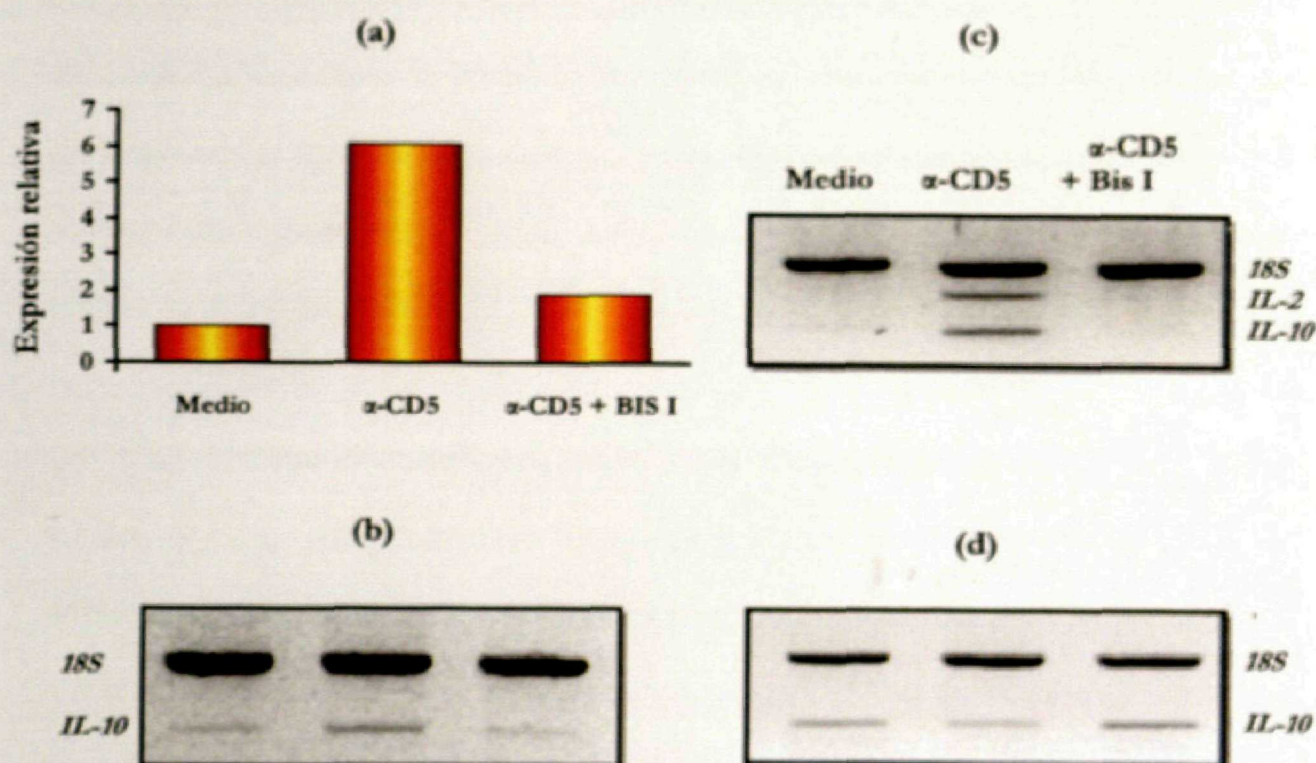
Se conoce que la estimulación vía CD5 participa en la producción de citocinas. Se ha descrito la producción de IL-2 en LT<sup>109</sup> y en células B-1a y B de LLC-B<sup>135</sup> estimulados con anti-CD5. Por otro lado, se ha visto que los LB CD5<sup>+</sup> producen mayor cantidad de IL-10 que los LB CD5<sup>-</sup> en respuesta a diversos estímulos y que esta producción es dependiente de la molécula CD5<sup>136</sup>. Con estos datos, se postuló que la señalización vía CD5 podría inducir la producción de IL-2 e IL-10, citocinas que, de forma autocrina, estarían implicadas en la viabilidad de las células neoplásicas. Para confirmarlo, se purificaron los LB de 6 muestras de LLC-B y se cultivaron en presencia o ausencia de anti-CD5. Tras 48 h, se extrajo el ARN y se amplificaron por RT-PCR fragmentos que codificaban para ambas citocinas.

Como se puede apreciar en la figura 29a, hay un notable aumento de la expresión génica de IL-10 en 4 de los 6 casos de LLC-B estudiados, mientras que descende en un caso (Figura 29d) y se mantiene igual en el otro. En todos los casos, la modulación de IL-10 estaba acompañada por la de Mcl-1. Por el contrario, tan sólo se encontró expresión de IL-2 en 1 de las 6 muestras (Figura 29c). Cuando se analizó la expresión proteica mediante ELISA, se observó un aumento en la producción de IL-10 al estimular con anti-CD5, mientras que nunca se observó aumento de IL-2 (no se muestran los datos). Estos resultados nos indican que la IL-10 tiene un papel importante en la viabilidad de los LB de LLC-B en respuesta a anti-CD5.

Además, se comprobó que PKC participaba en la producción de estas citocinas, puesto que la Bis I era capaz de revertir el aumento de IL-10 (Figura 29a), así como el



de IL-2 (Figura 29c). Es más, en el caso donde la expresión de IL-10 se veía disminuida (Figura 29d), al incubar con Bis I, se recuperaba, indicando una vez más el papel de PKC en la vía de señalización del CD5.



**Figura 29.- Expresión génica de IL-10 e IL-2 inducida por anti-CD5 en LLC-B.** Se cultivaron LB de 6 muestras de LLC-B con o sin anti-CD5. Se extrajo el ARN a las 48 h de cultivo y se amplificaron los genes de IL-2 e IL-10 por RT-PCR. El gráfico muestra el valor medio de la expresión relativa, referida al gen *ARN18S* de expresión constante, de las 4 muestras en que IL-10 era mayor al estimular con anti-CD5 (a); debajo se muestra el gel de agarosa de un caso representativo (b). A la derecha se muestra el caso en el que aumenta la expresión de ambas citocinas cuando se estimula con anti-CD5 (c) y el caso donde se reduce la expresión de IL-10 al estimular con anti-CD5 (d).







### **CD5 no modula la respuesta mediada por el BCR en LB de LLC-B**

Para funcionar apropiadamente en el sistema inmune los LB deben expresar receptores que puedan interaccionar con antígenos extraños y activar la señalización, al mismo tiempo que eviten la unión y señalización por antígenos propios. Durante el desarrollo de las células B existen puntos clave que controlan si éstas han reordenado los genes de los receptores de antígeno y que aseguran que expresen estos receptores potencialmente funcionales<sup>137</sup>. Para garantizar una correcta función de estas células, además de la expresión del BCR, se requiere una señalización efectiva a través de éste.

La señalización mediada por el BCR activa numerosas vías de transducción de señales, de forma que la inducción de una vía particular puede depender del estado de diferenciación del linfocito B, así como de la concentración de antígeno, la avidéz por el mismo y la duración del reconocimiento antigénico<sup>138,139</sup>. Pero la decisión de tomar una vía específica frente a otra también va a depender de una serie de señales positivas y negativas mediadas por diferentes co-receptores asociados al BCR<sup>140,141</sup>. Estos co-receptores responden a gran variedad de ligandos y se piensa que la integración de las señales iniciadas por el BCR y las señales de los co-receptores va a permitir al linfocito desencadenar una respuesta apropiada para cada tipo de antígeno<sup>142</sup>. Uno de estos co-receptores es el CD5, molécula propia de células B-1a y que se expresa tras activación en células B-2, además de estar constitutivamente presente en enfermedades linfoproliferativas como la LLC-B.

Actualmente se sabe que los LB de LLC-B son células que han reconocido antígeno<sup>50</sup>. Dado que en estas células el BCR es capaz de iniciar señales, tanto de



viabilidad como de apoptosis, nos preguntamos cuál era el papel que ejercía el CD5 sobre el BCR de estas células neoplásicas. Bikah *et al.* demostraron en células B-1 de ratones deficientes en CD5 que esta molécula podría jugar un papel en la modulación de la respuesta mediada por el BCR, actuando como regulador negativo<sup>106</sup>. La prevención de la apoptosis inducida por anti-IgM y la consiguiente proliferación descontrolada en estos ratones *knockout* sugiere que la expresión de CD5 tiene especial relevancia en la autorregulación de células B-1 maduras autorreactivas. Poco después, el mismo grupo observó que el entrecruzamiento de CD5 y la posterior estimulación con anti-IgM inducía la movilización de  $Ca^{2+}$  y la traslocación de NF- $\kappa$ B en células B-1 de ratón<sup>107</sup>. Nuestros resultados demuestran que el CD5 regula la señal del BCR en células B de individuos sanos, ya que rescata de la apoptosis inducida por anti-IgM a los LB de amígdala, lo que concuerda con lo publicado por Bikah *et al.* en células B-1 de ratón. Además, cuando separábamos el CD5 del BCR aumentaba la proliferación inducida por SAC + IL-2, coincidiendo con lo observado por Jamin *et al.*<sup>114</sup> y Pers *et al.*<sup>113</sup> en LB de amígdala. En cambio, nuestros datos indicaban que el entrecruzamiento de CD5 no era capaz de rescatar de la apoptosis mediada por anti-IgM ni de aumentar la señal proporcionada por SAC + IL-2 a los LB de LLC-B, lo que nos hace pensar que en estas células neoplásicas el CD5 no regula correctamente la señalización vía BCR. Ni siquiera cuando la señal de anti-IgM proporcionaba viabilidad, la ausencia de CD5 producía un aumento de la misma. Otro dato significativo es el hecho de que la fosforilación de las PTKs iniciada vía BCR no se incrementaba cuando el CD5 estaba alejado, confirmando una vez más la falta de regulación por esta molécula sobre el receptor de antígeno.



Estos datos sugieren que la incorrecta función del CD5 durante el reconocimiento antigénico ha podido contribuir a la expansión incontrolada de los LB de LLC-B. Por tanto, si el BCR de las células B de LLC-B es capaz de transmitir señales de viabilidad y el CD5 no es capaz de inhibirlas cuando es necesario, esto produciría una prolongada supervivencia en estas células, que resultaría incrementada en los llamados centros de proliferación, donde se ha visto que estos linfocitos son capaces de proliferar<sup>22,34</sup>.

### ***La viabilidad inducida por CD5 contribuye a la prolongada supervivencia de las células B de LLC-B***

Al estudiar la modulación de la fosforilación de PTKs por CD5, observamos que había un aumento de fosfotirosinas en respuesta a anti-CD5 en LB de LLC-B, lo que nos indicaba que el reconocimiento de un ligando por parte del CD5 disparaba su propia vía de señalización. Entonces nos propusimos analizar cuáles eran los efectos de esta vía en la viabilidad celular y contrastar los datos con los trabajos publicados. Encontramos que la estimulación vía CD5 proporciona viabilidad a un grupo importante de pacientes de LLC-B a las 120 h de cultivo. Aparentemente, estos datos contradicen lo publicado previamente en esta enfermedad. Mientras que Cioca y Kitano<sup>117</sup> observaron que anti-CD5 inducía apoptosis a las 24 h en los LB de algunos pacientes de LLC-B, Youniou *et al.*<sup>116</sup> encontraron el mismo efecto, con la diferencia de que, entre las muestras que sufrían apoptosis, unas lo hacían a las 18 h y otras a las 36 h. El comportamiento de nuestros pacientes a tiempos más cortos era bien distinto al observado a las 120 h. Cuando analizamos la viabilidad a las 48 h de cultivo, en algunas muestras se observó un aumento de la apoptosis y en otras no había diferencias, lo que se asemejaba con lo



descrito en la literatura<sup>116,117</sup>. Sin embargo, hay datos publicados acerca de una señalización positiva iniciada a través de CD5 en LB de LLC-B, donde se indica la producción intracelular de IL-2 y el aumento del número de células B proliferantes al estimular con anti-CD5<sup>135</sup>.

Por otra parte, también demostramos que la viabilidad mediada por CD5 es característica de los LB de LLC-B, ya que no encontramos ningún efecto en LB sanos y tan sólo ocasionalmente en LCM. Los estudios de viabilidad inducida por CD5 en linfocitos de individuos sanos son escasos. En LT humanos de sangre periférica se ha observado un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta a anti-CD5<sup>101,104</sup>, mientras que en LB no activados de amígdala la estimulación con este anticuerpo o induce apoptosis<sup>113</sup> o no tiene efecto<sup>114,143</sup>, esto último coincidiría con los resultados obtenidos en nuestro trabajo en células B de amígdala.

Independientemente del efecto observado, todos los trabajos encontraban cierta variabilidad en la respuesta frente a anticuerpos anti-CD5. Esta variabilidad podría estar relacionada con algún polimorfismo funcional en la molécula pero, hasta la fecha, no se ha detectado ninguno en las regiones codificantes del CD5 que pudiera justificar este hecho. Únicamente se conoce la existencia de un microsatélite situado en el promotor y, por nuestros resultados, tampoco parecía asociarse ni con la expresión de CD5 ni con su funcionalidad. Por tanto, deben ser otros factores, posiblemente diferentes a la molécula CD5, los que justifiquen la variabilidad observada.



### ***La respuesta frente a CD5 puede relacionarse con el desarrollo de la enfermedad***

Hasta hace poco la LLC-B se consideraba una entidad única con características biológicas y clínicas específicas. Sin embargo, en los últimos años, se han aportado muchos datos sobre la heterogeneidad de esta enfermedad<sup>46</sup>. El hecho de que algunos pacientes presenten un desarrollo favorable de la enfermedad, frente a otro grupo con enfermedad progresiva y resistente al tratamiento, ha disparado la necesidad de encontrar un marcador biológico fácil de analizar que pueda utilizarse como indicador pronóstico, con el objetivo de adoptar medidas terapéuticas más adecuadas.

Actualmente se piensa que la base de esta heterogeneidad puede ser el tipo de antígeno al que responden los LB tumorales. Por lo tanto, el comportamiento *in vitro* frente a antígeno podría ser un factor pronóstico más fiable que cualquier otro marcador<sup>63,71</sup>. Sin embargo, por el momento se desconoce cuál/es puede/n ser el/los antígeno/s reconocido/s por estas células neoplásicas, por ello, los estudios en esta dirección utilizan estímulos específicos del BCR, con el fin de distinguir entre ambos grupos de pacientes. Nuestros resultados mostraron que los pacientes de LLC-B también podían dividirse en dos grupos según el grado de respuesta frente a anti-CD5, los cuales coincidían con los obtenidos al estimular las células con anti-IgM 0,1 µg/ml. Esto nos sugería que podían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad.

De hecho, al comparar los grupos de respuesta frente a CD5 en función de una serie de marcadores de superficie, observamos que las muestras que más respondían presentaban una mayor expresión de marcadores de activación tardíos, como son el CD39, CD62L y CD71, los cuales se han relacionado con un desarrollo más favorable



de la enfermedad y con pacientes que presentan mutaciones en los genes de las IgV<sub>H</sub><sup>66</sup>. Por otro lado, el grupo de menor respuesta tenía mayor expresión de marcadores de activación temprana, CD38, CD40 y CD69, que se han asociado con muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas y con peor pronóstico<sup>66</sup>. Además, encontramos que las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas mostraban mayor expresión de CD11a y CD49d, lo que coincide con la asociación descrita de ambos marcadores con estadios más tardíos (Rai III y IV)<sup>124</sup>; y las que tenían IgV<sub>H</sub> mutadas presentaban mayor expresión de CD11b, relacionado con estadios tempranos de la enfermedad (Rai 0, I y II)<sup>124</sup>, y de CD23, como ya se ha publicado anteriormente<sup>68</sup>. Esto indica que las muestras pertenecientes al grupo de alta respuesta pueden coincidir con muestras de pacientes con mejor pronóstico y que presentan IgV<sub>H</sub> mutadas. Posteriormente, comprobamos que estos marcadores de superficie correlacionaban perfectamente con el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub> de nuestros pacientes.

Por otra parte, al estudiar los diversos marcadores de superficie advertimos que el CD38, marcador relacionado con un curso desfavorable de la enfermedad y con pacientes que presentan IgV<sub>H</sub> no mutadas<sup>48</sup>, estaba más expresado en muestras que no respondían frente a los dos estímulos. Previamente se habían publicado varios trabajos de estimulación vía BCR en función de la positividad para este marcador, Zupo *et al.*<sup>70</sup> defendían que el anti-IgM conducía a apoptosis en células B de LLC-B que expresan CD38, pero no en las CD38<sup>-</sup>. Realmente, no se pueden comparar ambos resultados, ya que las condiciones de trabajo utilizadas por este grupo diferían de las nuestras, siendo la concentración de anti-IgM mucho más alta.



Cuando analizamos la respuesta de ambos estímulos frente al estado mutacional de las IgV<sub>H</sub> observamos que los LB de pacientes con IgV<sub>H</sub> mutadas tenían una mayor respuesta a anti-CD5 y a anti-IgM 0,1 µg/ml que las células B con IgV<sub>H</sub> no mutadas. En principio, esto no parecía coincidir con lo referido en la literatura, donde se describe que las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas responden mejor a estímulos propios del BCR<sup>71</sup>. Esta discrepancia puede deberse al tipo de ensayo utilizado en el estudio de Lanham *et al.*<sup>71</sup>. En realidad, este grupo determina el nivel de fosfotirosinas en respuesta a altas concentraciones de anti-IgM, pero no analiza el efecto de esta estimulación en viabilidad. Centrándonos en nuestros resultados, pudimos comprobar que el incremento en fosfotirosinas al estimular con anti-IgM 10 µg/ml era mucho mayor en las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas. Sin embargo, esas mismas muestras no presentaban mayor viabilidad en respuesta a anti-IgM 0,1 µg/ml, es decir, pertenecían al grupo denominado por nosotros "de baja viabilidad frente a anti-CD5 o anti-IgM 0,1 µg/ml". Por el contrario, las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas sí que respondían mejor a SAC + IL-2. Este dato es muy importante porque nos indica que ambos grupos responden de diferente manera según la naturaleza del estímulo recibido, lo que concordaría con la hipótesis de que los clones tumorales de ambos tipos se expandieron en respuesta a estímulos diferentes<sup>50</sup>. Se ha sugerido que las células B tumorales con IgV<sub>H</sub> no mutadas responden a estímulos T-independiente, como pueden ser los antígenos polisacáridos o la SAC + IL-2 utilizada en nuestro estudio, mientras que las que presentan IgV<sub>H</sub> mutadas lo hacen a estímulos T-dependiente, ya que sus genes IgV<sub>H</sub> han madurado su afinidad. Estas diferencias podrían justificar que los pacientes con IgV<sub>H</sub> no mutadas pudiesen responder a una variedad de antígenos más amplia y con menor afinidad. Por esta razón, se expandirían antes y de una manera más incontrolada, presentando un desarrollo más rápido de la enfermedad y, por tanto, un peor pronóstico. Además, está



descrito que las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutadas presentan telómeros más cortos, indicativo de un mayor número de divisiones celulares<sup>144</sup>. Se ha sugerido que esto se debe a su mayor capacidad de responder a estímulos vía BCR<sup>145</sup>. Nosotros pensamos que el BCR de ambos grupos de pacientes es capaz de responder frente a antígeno, pero, debido a su especificidad, es probable que los LB con IgV<sub>H</sub> no mutadas encuentren más fácilmente un antígeno al que responder, de ahí que proliferen más frecuentemente.

En los dos últimos años ha cobrado mucha importancia el análisis de la proteína ZAP-70<sup>65</sup>, ya que se ha observado que las muestras ZAP-70<sup>+</sup> no presentan mutaciones en los genes IgV<sub>H</sub> y, además, se asocian con un peor pronóstico<sup>64</sup>. Incluso algunos grupos defienden que es un indicador pronóstico mejor aún que el estado mutacional de las IgV<sub>H</sub>, el cual no siempre coincide con el desarrollo de la enfermedad<sup>146</sup>. Nosotros encontramos que la mayoría de las muestras ZAP-70<sup>+</sup> no presentaban mutaciones IgV<sub>H</sub> y viceversa. Hay un trabajo donde se estudia la mayor respuesta frente a anti-IgM en células ZAP-70<sup>+</sup><sup>63</sup>, en este sentido, nuestros datos de viabilidad no se correlacionan con el porcentaje de ZAP-70, lo que podría deberse al bajo número de muestras ZAP-70<sup>+</sup> que encontramos o al hecho de que es difícil establecer un punto de corte que discrimine entre muestras positivas y negativas. Sería necesario aumentar el tamaño de la muestra para comprobar si los pacientes que presentan positividad para ZAP-70 tienen una menor respuesta a los estímulos utilizados en nuestro trabajo.

### **La viabilidad mediada por CD5 depende de un mecanismo que implica a la PKC**

Una vez comprobado que anti-CD5 era capaz de inducir viabilidad en los LB de LLC-B, nos propusimos profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la



misma. Encontramos que la expresión génica y proteica de Mcl-1 aumentaba en las células estimuladas con anti-CD5. Esta proteína anti-apoptótica de la familia de Bcl-2 se ha relacionado con la resistencia de los LB de LLC-B a la quimioterapia<sup>32</sup>.

Se dispone de pocos datos acerca de la vía de señalización iniciada a través de CD5. Simarro *et al.* observaron la participación de la PC-PLC y la PKC- $\zeta$  en células Jurkat estimuladas con anti-CD5<sup>112</sup>, mientras que Gringhuis *et al.* describieron la implicación de la PI3-K y la CaMK IV en LT humanos de sangre periférica<sup>109</sup>. Estas diferencias podrían deberse a la fuente celular utilizada y al tipo de estímulo. Los resultados de Simarro *et al.* parecen más específicos, dado que tan sólo estimulan con anti-CD5, mientras que el grupo de Gringhuis coestimula con anti-CD5 células preactivadas con PHA + anti-CD28, lo que no asegura que la señalización haya sido disparada por TCR, por CD5 o conjuntamente por ambos. Nosotros utilizamos células B de LLC-B estimuladas tan sólo con anti-CD5, lo que nos aseguraba que los resultados observados se debiesen exclusivamente al CD5. Nuestros datos demuestran que PKC está implicada en la viabilidad mediada por CD5, ya que observamos un descenso de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 al inhibir esta molécula con un inhibidor específico, la Bis I.

La familia de las PKCs está involucrada en una gran variedad de desórdenes celulares en los cuales las vías de transducción de señales están alteradas<sup>147,148</sup>. En LB de LLC-B la activación de PKC se ha implicado en la supresión de apoptosis espontánea e inducida por drogas<sup>131</sup>. La incubación de células de LLC-B con briostatina-1, una molécula que estructuralmente mimetiza el DAG y que activa PCK, aumenta Mcl-1 y XIAP, lo que produce una gran resistencia a la apoptosis. Esto



concordaría con nuestros resultados, en los que vemos un aumento de Mcl-1 y en algunos casos de XIAP al estimular con anti-CD5, aumento que se revierte al inhibir la PKC. Sin embargo, no se sabe qué isoforma es importante en la regulación de la apoptosis de estos linfocitos tumorales. Ringshausen *et al.*<sup>132</sup> concluyen que es PKC- $\delta$  la que podría tener un papel predominante en la prevención de apoptosis, ya que en su estudio no detectaron ningún cambio en la apoptosis al incubar con inhibidores específicos de otras isoformas. Dado que el inhibidor utilizado en nuestro trabajo no es específico de la PKC- $\zeta$  (implicada en la vía de señalización estudiada por Simarro *et al.*<sup>112</sup>), sino de otras isoformas, solo podemos descartar la participación de PKC- $\zeta$  en la vía de señalización disparada vía CD5 en LLC-B. Sin embargo, datos obtenidos en ratones *knockout* para PKC- $\delta$  indican que esta isoforma es un componente indispensable de una ruta de señalización específica para la inducción de tolerancia en células B, además, la isoforma PKC- $\delta$  no parece participar en la proliferación de linfocitos B<sup>149</sup>. Dada la participación de CD5 en la inducción de tolerancia<sup>150</sup> y, puesto que nosotros no observamos proliferación en respuesta a anti-CD5, pensamos que la PKC- $\delta$  podría ser importante en la vía del CD5 en las células B de LLC-B. Sin embargo, son necesarios estudios de inhibición específica de las diferentes isoformas de PKC para poder confirmar este punto.

La producción de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS y PMA

Una vez demostrado que la ruta de señalización de CD5 implica el aumento de Mcl-1 por un mecanismo dependiente de PKC, observamos que esta ruta conducía al incremento de IL-10. La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria secretada por monocitos/macrófagos, células Th<sub>2</sub> y células B estimuladas<sup>151</sup>. Esta citocina induce el crecimiento y la diferenciación de LB humanos normales a células secretoras de inmunoglobulinas y previene la apoptosis de células B del CG<sup>152</sup>. En LB de LLC-B se



ha observado que promueve la síntesis de ADN y la producción de IgM cuando las células están preactivadas con anti-CD40<sup>153</sup>. Por el contrario, cuando se utiliza de forma aislada, la IL-10 media apoptosis en células de LLC-B no activadas, de manera dependiente de dosis<sup>154</sup>, aunque otros estudios demuestran que en células recién extraídas media supervivencia y no apoptosis<sup>155</sup>. También se ha visto que la unión de IL-10 a su receptor en LLC-B resulta en la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, inhibe la proliferación de células B, aumenta la diferenciación, pero no induce apoptosis, de hecho, reduce la apoptosis inducida por hidrocortisona<sup>155</sup>.

Hay datos que relacionan la expresión génica de IL-10 con un mejor pronóstico de la LLC-B<sup>156</sup>, lo que apoyaría el hecho de que las muestras con IgV<sub>H</sub> mutadas de nuestro estudio sean capaces de expresar mayor cantidad de esta citocina al ser estimuladas con anti-CD5. Sin embargo, otros autores han encontrado que la alta expresión de IL-10 en suero está relacionada con mal pronóstico<sup>157</sup>.

Además, comprobamos que la inducción de IL-10 mediada por CD5 se veía revertida al inhibir la PKC, lo que nos confirma una vez más el papel de PKC en la ruta del CD5. Hay varios trabajos en los que se define la aportación de la PKC y la PI3-K en la producción de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS y PMA/ionomicina<sup>158-160</sup>. Esto coincidiría con lo descrito por Gringhuis *et al.* en relación a la estimulación vía CD5, en la cual se ve implicada la PI3-K<sup>109</sup>.

Los trabajos publicados acerca de la ruta de señalización del CD5 parecen indicar que este receptor puede disparar dos vías distintas de señalización, una mediada por PLC<sup>109</sup> y la otra por PI3-K<sup>112</sup>, molécula involucrada en la activación de la PKC- $\delta$  en



otras vías de señalización<sup>132</sup>. Esto mismo podría estar ocurriendo en los LB de LLC-B, en la cual la estimulación del CD5 disparasen ambas rutas, que confluyesen en la activación de la PKC- $\delta$  por DAG<sup>149</sup> (proveniente de la acción de la PLC) o por PIP<sub>3</sub><sup>161</sup> (producido por PI3-K). Además, se sabe que PKC- $\delta$  es capaz de activar factores de transcripción como STATs<sup>162</sup>, que, a su vez, pueden regular la expresión de IL-10<sup>164</sup>.

Basándonos en nuestros resultados y las observaciones hechas por otros grupos, proponemos un modelo para la vía de señalización inducida por CD5 en LB de pacientes de LLC-B (Figura 30). La unión de un ligando a CD5 produciría la fosforilación de ciertas PTKs, entre ellas Lyn, Fyn y, posiblemente, Lck. Por mediación de éstas se activarían dos rutas independientes: la ruta de la PI3-K y la ruta de la PLC. La PI3-K transformaría PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>, el cual activaría a PKC- $\delta$ . Por otro lado, PLC hidrolizaría PIP<sub>2</sub> en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y en DAG, activando éste a PKC- $\delta$ . Ésta podría activar a ciertos factores de transcripción como STAT-3, lo que conduciría a un aumento de la transcripción de IL-10 y de Mcl-1. Mcl-1 evitaría así que se liberasen diversas proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria, mientras que la IL-10 podría tener un efecto autocrino sobre los LB de LLC-B, activando diversos factores de transcripción, como STAT-1 y STAT-3.

Resumiendo, el CD5 es una molécula cuya función es inhibir la señalización iniciada a través del BCR en LB. Ya que en LLC-B parece no cumplir esta función, puede contribuir a la expansión clonal inicial, además de al mantenimiento de las señales que hacen que la célula tumoral sobreviva. Por otra parte, la estimulación vía CD5 proporciona viabilidad a las células B neoplásicas, es posible que la interacción del CD5 con sus ligandos pueda contribuir a la estimulación de células transformadas así



como de clones autorreactivos, mediante la interacción de las  $V_H^{95}$  o del CD72<sup>91</sup> con el CD5 de la misma célula o de células B vecinas. Además de la estimulación entre las propias células B neoplásicas, los ligandos del CD5 se encuentran ampliamente distribuidos, el CD72 aparece en células foliculares dendríticas, macrófagos del bazo, células de Kupffer e incluso en timocitos de MO; la gp35-37 en esplenocitos, células B y clones Th1 y Th2 activados<sup>93</sup>, pudiendo tener un papel importante en la coestimulación célula B-célula T durante la respuesta inmune T-dependiente; y el ligando descrito por Calvo *et al.*<sup>96</sup>, en linfocitos y monocitos de sangre periférica y en diversas líneas celulares de origen epitelial, mielomonocítica y linfoide (T y B). Por tanto, sea cual sea el compartimento donde se encuentren los LB tumorales, el CD5 podría encontrar un ligando, favoreciendo así el mantenimiento de la viabilidad de estas células y previniendo su eliminación del sistema inmune.

### ***Implicación clínica***

El conocimiento de rutas de señalización alteradas en la LLC-B puede abrir nuevas oportunidades en el tratamiento de esta neoplasia. La importancia de la PKC en la regulación de la proliferación y apoptosis celular y, como consecuencia, en la formación de tumores, sugiere que es un objetivo potencial para el desarrollo de agentes anticancerígenos<sup>165</sup>. Se han probado varios inhibidores de la PKC en ensayos clínicos<sup>166</sup>, los cuales han demostrado tener actividad antiproliferativa en diversos tumores *in vitro*<sup>167</sup>. En particular, por lo descrito en la literatura y por los resultados obtenidos en nuestro estudio, la inhibición de PKC- $\delta$  u otras isoformas puede suponer un prometedor acercamiento en el tratamiento de la LLC-B.



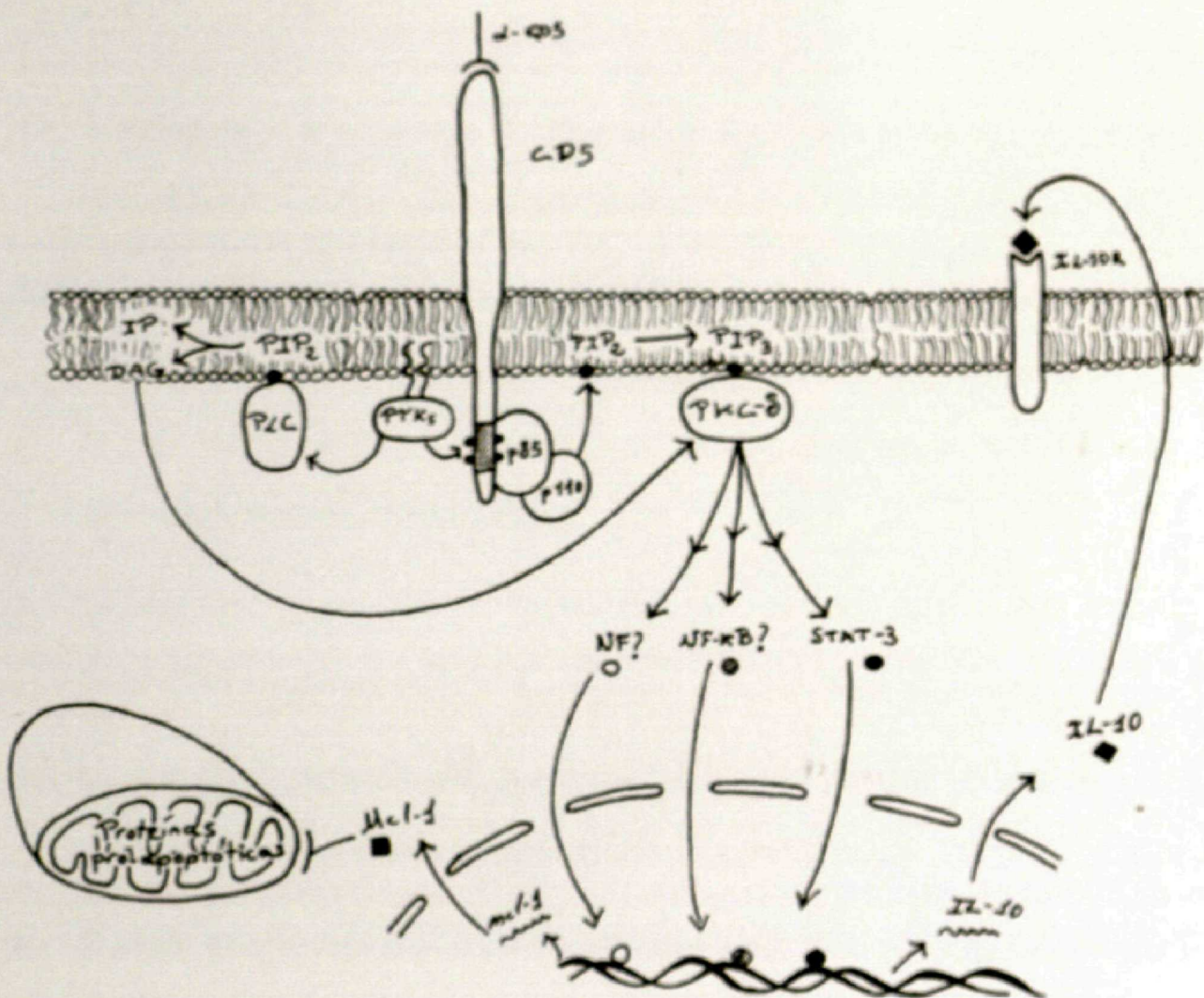


Figura 30.- Modelo de la vía de señalización inducida por CD5 en LB de LLC-B.



Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- 1.- A diferencia de lo encontrado en LB de superficie, en tejidos linfáticos de LLC-B afecta a la vía de señalización llevada a cabo por el B de LLC-B.
- 2.- Anti-CD3 proporciona vitalidad a las LB de un amplio grupo de pacientes de LLC-B, distinguiéndose dos grupos en respuesta a este estímulo, uno de alta y otro de baja vitalidad. Por el contrario, anti-CD3 no proporciona vitalidad a las células B de rangos de los controles.
- 3.- La respuesta a anti-CD3 es consistente con la observada frente a bajas concentraciones de anti-IgM.
- 4.- La vitalidad proporcionada por anti-CD3 a las células B depende de la mantenimiento de la misma pero no afecta a la proliferación.
- 5.- El grupo de respuesta de alta vitalidad frente a anti-CD3 es similar al grupo de respuesta propio de LB con IgV $\lambda$  y  $\mu$  chains, mientras que el de baja vitalidad presenta marcadores propios de células B.

## CONCLUSIONES

- 6.- Las células de LLC-B CD3<sup>+</sup> responden mejor a la vitalidad proporcionada por anti-CD3 a bajas concentraciones.
- 7.- Los pacientes de LLC-B con IgV $\lambda$  presentan respuestas mejor a anti-CD3 a bajas IgM, mientras que los que presentan IgV $\lambda$  y  $\mu$  chains responden mejor a anti-CD3 a IL-2.
- 8.- La vitalidad inducida por anti-CD3 implica a la FcR, la cual provee la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la síntesis de IL-10.



Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- 1.- A diferencia de lo encontrado en LB de amígdala, el entrecruzamiento de CD5 no afecta a la vía de señalización iniciada a través del BCR en LB de LLC-B.
- 2.- Anti-CD5 proporciona viabilidad a los LB de un amplio grupo de pacientes de LLC-B, distinguiéndose dos grupos en respuesta a este estímulo, uno de alta y otro de baja viabilidad. Por el contrario, anti-CD5 no proporciona viabilidad a las células B de ninguno de los controles.
- 3.- La respuesta a anti-CD5 se correlaciona con la observada frente a bajas concentraciones de anti-IgM.
- 4.- La viabilidad proporcionada por anti-CD5 o por anti-IgM es debida a un mantenimiento de la misma y no a un efecto de la proliferación.
- 5.- El grupo de respuesta de alta viabilidad frente a anti-CD5 o anti-IgM presenta un fenotipo propio de LB con IgV<sub>H</sub> mutadas, mientras que el de baja viabilidad presenta marcadores propios de células con IgV<sub>H</sub> no mutadas.
- 6.- Las muestras de LLC-B CD38<sup>-</sup> responden mejor a la estimulación con anti-CD5 o con anti-IgM a bajas concentraciones.
- 7.- Los pacientes de LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutadas responden mejor a anti-CD5 o anti-IgM, mientras que los que presentan IgV<sub>H</sub> no mutadas responden mejor a SAC + IL-2.
- 8.- La viabilidad inducida por anti-CD5 implica a la PKC, la cual modula la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 y la síntesis de IL-10.



1. Galton D.A. (1966) The inheritance of human height as a quantitative trait. *Med. J. Aust.* 99: 1945-1947.
2. Dornesick W. (1967) Genetic inheritance of human height as a quantitative trait of biologically interacting genes. *Ann. Hum. Genet.* 31: 1-14.
3. Christ Brown W.M., Dahl E. (1967) Human inheritance: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1968-1970.
4. Rasmus C., Magnusson B. (1968) Genetic inheritance of human height. *Am. Med. J.* 124: 1970-1971.
5. Bengtsson C., Dahl E. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1971-1972.
6. Nussli J.J., Nussli J.J. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1972-1973.
7. Dahl E., Bengtsson C. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1973-1974.
8. Bengtsson C., Dahl E. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1974-1975.
9. Dahl E., Bengtsson C. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1975-1976.
10. Dahl E., Bengtsson C. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1976-1977.

## BIBLIOGRAFÍA

11. Rasmus C., Magnusson B. (1968) Genetic inheritance of human height. *Am. Med. J.* 124: 1970-1971.
12. Dahl E., Bengtsson C. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1973-1974.
13. Dahl E., Bengtsson C. (1968) Genetic inheritance of human height: studies in quantitative relation to statistics. *Am. Med. J.* 44: 1975-1976.



1. Galton D.A. (1966) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia *Can. Med. Assoc. J.* **94**: 1005-1010.
2. Dameshek W. (1967) Chronic lymphocytic leukemia: an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. **29**: Suppl: 84.
3. Court Brown W.M., Doll R. (1959) Adult leukaemia; trends in mortality in relation to aetiology. *Br. Med. J.* **46**: 1063-1069.
4. Rozman C., Montserrat E. (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1052-1057.
5. Bannerji R., Byrd JC. (2000) Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* **12**: 22-29.
6. Neuland C.Y., Blattner W.A., Mann D.L., Fraser M.C., Tsai S., Strong D.M. (1983) Familial chronic lymphocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**: 1143-1150.
7. Finch S.C., Linet M.S. (1992) Chronic leukaemias. *Baillieres Clin. Haematol.* **5**: 27-56.
8. Hamblin T. (2000) Historical aspects of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **111**: 1023-1034.
9. Montserrat E., Rozman C. (1995) Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Ann. Oncol.* **6**: 219-235.
10. Raffeld M., Jaffe E.S. (1991) bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood*. **78**: 259-263.
11. Rozman C., Hernandez-Nieto L., Montserrat E., Bragues R. (1981) Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **47**: 529-537.
12. Decorte R., Wu R., Marynen P., Cassiman J.J. (1994) Identification of internal variation in the pseudoautosomal VNTR DXYS17, with nonrandom distribution of the alleles on the X and the Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **54**: 506-515.
13. Caligaris-Cappio F. (2000) Cellular interactions, immunodeficiency and autoimmunity in CLL. *Hematol. Cell. Ther.* **42**: 21-25.



14. Kipps T.J., Carson D.A. (1993) Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*. **81**: 2475-2487.
15. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S. (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **46**: 219-234.
16. Binet J.L., Lepoprier M., Dighiero G., *et al.* (1977) A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. **40**: 855-864.
17. Montserrat E., Sanchez-Bisno J., Vinolas N., Rozman C. (1986) Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br. J. Haematol.* **62**: 567-575.
18. Montserrat E., Bragues R.M., Vives Corrons J.L., Rozman C. (1982) Bone-marrow necrosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Lab. Haematol.* **4**: 94.
19. Rai K.R., Chiorazzi N. (2003) Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1797-1799.
20. Rai K.R., Peterson B.L., Appelbaum F.R., *et al.* (2000) Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1750-1757.
21. Kipps T.J. (2002) Advances in classification and therapy of indolent B-cell malignancies. *Semin. Oncol.* **29**: 98-104.
22. Schmid C., Isaacson P.G. (1994) Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. **24**: 445-451.
23. Ternynck T., Dighiero G., Follezou J., Binet J.L. (1974) Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants. *Blood*. **43**: 789-795.
24. Oppezio P., Magnac C., Bianchi S., *et al.* (2002) Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia*. **16**: 2438-2446.
25. Fais F., Sellars B., Ghiotto F., *et al.* (1996) Examples of in vivo isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* **98**: 1659-1666.



26. Jennings C.D., Foon K.A. (1997) Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. **90**: 2863-2892.
27. Reed J.C. (1998) Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* **25**: 11-18.
28. Collins R.J., Verschuer L.A., Harmon B.V., Prentice R.L., Pope J.H., Kerr J.F. (1989) Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.* **71**: 343-350.
29. Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J.C. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **82**: 1820-1828.
30. Jia L., Macey M.G., Yin Y., Newland A.C., Kelsey S.M. (1999) Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. *Blood*. **93**: 2353-2359.
31. Reed J.C. (1998) Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia: implications for therapy. *Semin. Hematol.* **35**: 3-13.
32. Kitada S., Andersen J., Akar S., *et al.* (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. **91**: 3379-3389.
33. Kitada S., Zapata J.M., Andreeff M., Reed J.C. (1999) Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **106**: 995-1004.
34. Granziero L., Ghia P., Circosta P., *et al.* (2001) Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **97**: 2777-2783.
35. Cuni S., Perez-Aciego P., Perez-Chacon G., *et al.* (2004) A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. **18**: 1391-1400.
36. Bentley D.P., Pepper C.J. (2000) The apoptotic pathway: a target for therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.* **18**: 87-98.
37. Ghia P., Granziero L., Chilosi M., Caligaris-Cappio F. (2002) Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **12**: 149-155.



38. Ghia P., Caligaris-Cappio F. (2000) The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv. Cancer Res.* **79**: 157-173.
39. Panayiotidis P., Jones D., Ganeshaguru K., Foroni L., Hoffbrand A.V. (1996) Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br. J. Haematol.* **92**: 97-103.
40. Lagneaux L., Delforge A., Bron D., De B.C., Stryckmans P. (1998) Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* **91**: 2387-2396.
41. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood.* 2002;100:1795-1801.
42. Meinhardt G., Wendtner C.M., Hallek M. (1999) Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J. Mol. Med.* **77**: 282-293.
43. Mainou-Fowler T., Copplestone J.A., Prentice A.G. (1995) Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *J. Clin. Pathol.* **48**: 482-487.
44. Burger J.A., Tsukada N., Burger M., Zvaifler N.J., Dell'Aquila M., Kipps T.J. (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood.* **96**: 2655-2663.
45. Pistoia V. (1997) Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol. Today.* **18**: 343-350.
46. D'Arena G., Di Renzo N., Brugiattelli M., Vigliotti M.L., Keating M.J. (2003) Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* **44**: 223-228.
47. Schroeder H.W., Jr., Dighiero G. (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today.* **15**: 288-294.
48. Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **94**: 1840-1847.



49. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G., Stevenson F.K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94**: 1848-1854.
50. Chiorazzi N., Ferrarini M. (2003) B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 841-894.
51. Hamblin T.J., Orchard J.A., Ibbotson R.E., *et al.* (2002) CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. **99**: 1023-1029.
52. Chang C.C., Cleveland R.P. (2002) Conversion of CD38 and/or myeloid-associated marker expression status during the course of B-CLL: association with a change to an aggressive clinical course. *Blood*. **100**: 1106.
53. Thornton P.D., Fernandez C., Giustolisi G.M., *et al.* (2004) CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol. J.* **5**: 145-151.
54. Chang C.C., Liu C.Z., Cleveland R.P. (2003) Relative importance of CD38 expression over myeloid-associated markers expression in predicting the clinical course of B-CLL patients. *Leuk. Lymphoma*. **44**: 977-982.
55. Krober A., Seiler T., Benner A., *et al.* (2002) V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **100**: 1410-1416.
56. Lin K., Sherrington P.D., Dennis M., Matrai Z., Cawley J.C., Pettitt A.R. (2002) Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **100**: 1404-1409.
57. Domingo-Domenech E., Domingo-Claros A., Gonzalez-Barca E., *et al.* (2002) CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica*. **87**: 1021-1027.
58. Ghia P., Guida G., Stella S., *et al.* (2003) The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. **101**: 1262-1269.
59. Thunberg U., Johnson A., Roos G., *et al.* (2001) CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **97**: 1892-1894.



60. Durig J., Naschar M., Schmucker U., *et al.* (2002) CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. **16**: 30-35.
61. Del Poeta G., Maurillo L., Venditti A., *et al.* (2001) Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **98**: 2633-2639.
62. Ibrahim S., Keating M., Do K.A., *et al.* (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **98**: 181-186.
63. Chen L., Widhopf G., Huynh L., *et al.* (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **100**: 4609-4614.
64. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., *et al.* (2001) Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**: 1639-1647.
65. Crespo M., Bosch F., Villamor N., *et al.* (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1764-1775.
66. Damle R.N., Ghiotto F., Valetto A., *et al.* (2002) B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. **99**: 4087-4093.
67. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., *et al.* (2001) Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* **194**: 1625-1638.
68. Damle R.N., Fais F., Ghiotto F., *et al.* (2000) Chronic lymphocytic leukemia: a proliferation of B cells at two distinct stages of differentiation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **252**: 285-292.
69. Zupo S., Isnardi L., Megna M., *et al.* (1996) CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood*. **88**: 1365-1374.
70. Zupo S., Massara R., Dono M., *et al.* (2000) Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood*. **95**: 1199-1206.
71. Murray R.Z., Norbury C. (2000) Proteasome inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Drugs*. **11**: 407-417.



72. Lozano F., Simarro M., Calvo J., *et al.* (2000) CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit. Rev. Immunol.* **20**: 347-358.
73. Resnick D., Pearson A., Krieger M. (1994) The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 5-8.
74. Boyse E.A., Miyazawa M., Aoki T., Old L.J. (1968) Ly-A and Ly-B: two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **170**: 175-193.
75. Boumsell L., Bernard A., Lepage V., Degos L., Lemerle J., Dausset J. (1978) Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur. J. Immunol.* **8**: 900-904.
76. Hardy R.R., Carmack C.E., Li Y.S., Hayakawa K. (1994) Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5<sup>+</sup> B cells. *Immunol. Rev.* **137**: 91-118.
77. Morikawa K., Oseko F., Morikawa S. (1993) Induction of CD5 antigen on human CD5<sup>-</sup> B cells by stimulation with *Staphylococcus aureus* Cowan strain I. *Int. Immunol.* **5**: 809-816.
78. Freeman M., Ashkenas J., Rees D.J., *et al.* (1990) An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 8810-8814.
79. Bofill M., Janossy G., Janossa M., *et al.* (1985) Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J. Immunol.* **134**: 1531-1538.
80. Hardy R.R., Hayakawa K., Shimizu M., Yamasaki K., Kishimoto T. (1987) Rheumatoid factor secretion from human Leu-1<sup>+</sup> B cells. *Science.* **236**: 81-83.
81. Youinou P., Jamin C., Lydyard P.M. (1999) CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol. Today.* **20**: 312-316.
82. Caligaris-Cappio F., Gobbi M., Bofill M., Janossy G. (1982) Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **155**: 623-628.
83. Wortis H.H., Teutsch M., Higer M., Zheng J., Parker D.C. (1995) B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**: 3348-3352.



84. Hecht B.K., Kipps T., Johnston N.K., Cannizaro L.A. (1989) Leu-1 (CD5) cell surface antigen mapped to 11q13 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **51**: 1012-1019.
85. Padilla O., Calvo J., Vila J.M., *et al.* (2000) Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics.* **51**: 993-1001.
86. Calvo J., Sole J., Simarro M., Vives J., Lozano F. (1996) Evolutionarily conserved transcription regulatory elements within the 5'-flanking region of the human CD5 gene. *Tissue Antigens.* **47**: 257-261.
87. Calvo J., Maertzdorf J., Roca A., *et al.* (1997) Conservation of a polymorphic microsatellite at orthologous positions in the human and mouse CD5 gene promoter. *Immunogenetics.* **45**: 233-234.
88. Lopez-De L.L., Calvo J., Sanz-Vaque L., *et al.* (2002) Genomic instability at the human CD5 gene promoter. *Haematologica.* **87**: 235-241.
89. Starling G.C., Llewellyn M.B., Whitney G.S., Aruffo A. (1997) The Ly-1.1 and Ly-1.2 epitopes of murine CD5 map to the membrane distal scavenger receptor cysteine-rich domain. **49**: 1-6.
90. Jones N.H., Clabby M.L., Dialynas D.P., Huang H.J., Herzenberg L.A., Strominger J.L. (1986) Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature.* **323**: 346-349.
91. Van de Velde H., von Hoegen I., Luo W., Parnes J.R., Thielemans K. (1991) The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature.* **351**: 662-665.
92. Parnes J.R., Pan C. (2000) CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness. *Immunol. Rev.* **176**: 75-85.
93. Biancone L., Bowen M.A., Lim A., Aruffo A., Andres G., Stamenkovic I. (1996) Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J. Exp. Med.* **184**: 811-819.
94. Mage R.G., Pospisil R. (2000) CD5 and other superantigens may select and maintain rabbit self-renewing B-lymphocytes and human B-CLL cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **252**: 87-96.
95. Pospisil R., Silverman G.J., Marti G.E., Aruffo A., Bowen M.A., Mage R.G. (2000) CD5 is A potential selecting ligand for B-cell surface immunoglobulin: a possible role in maintenance and selective expansion of normal and malignant B cells. *Leuk. Lymphoma.* **36**: 353-365.



96. Calvo J., Places L., Padilla O., *et al.* (1999) Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur. J. Immunol.* **29**: 2119-2129.
97. Calvo J., Padilla O., Places L., *et al.* (1999) Relevance of individual CD5 extracellular domains on antibody recognition, glycosylation and co-mitogenic signalling. *Tissue Antigens.* **54**: 16-26.
98. Beyers A.D., Spruyt L.L., Williams A.F. (1992) Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**: 2945-2949.
99. Lankester A.C., van Schijndel G.M., Cordell J.L., van Noesel C.J., van Lier R.A. (1994) CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur. J. Immunol.* **24**: 812-816.
100. Alberola-Ila J., Places L., Cantrell D.A., Vives J., Lozano F. (1992) Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* **148**: 1287-1293.
101. June C.H., Rabinovitch P.S., Ledbetter J.A. (1987) CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J. Immunol.* **138**: 2782-2792.
102. Ceuppens J.L., Baroja M.L. (1986) Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J. Immunol.* **137**: 1816-1821.
103. Spertini F., Stohl W., Ramesh N., Moody C., Geha R.S. (1991) Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J. Immunol.* **146**: 47-52.
104. Imboden J.B., June C.H., McCutcheon M.A., Ledbetter J.A. (1990) Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *J. Clin. Invest.* **85**: 130-134.
105. Tarakhovsky A., Turner M., Schaal S., *et al.* (1995) Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature.* **374**: 467-470.
106. Bikah G., Carey J., Ciallella J.R., Tarakhovsky A., Bondada S. (1996) CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science.* **274**: 1906-1909.



107. Sen G., Bikah G., Venkataraman C., Bondada S. (1999) Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3319-3328.
108. Perez-Villar J.J., Whitney G.S., Bowen M.A., Hewgill D.H., Aruffo A.A., Kanner S.B. (1999) CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2903-2912.
109. Gringhuis S.I., de Leij L.F., Coffey P.J., Vellenga E. (1998) Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1725-1735.
110. Ochi H., Watanabe T. (2000) Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity. *Int. Immunol.* **12**: 1417-1423.
111. Raman C., Kuo A., Deshane J., Litchfield D.W., Kimberly R.P. (1998) Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J. Biol. Chem.* **273**: 19183-19189.
112. Simarro M., Calvo J., Vila J.M., *et al.* (1999) Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Immunol.* **162**: 5149-5155.
113. Pers J.O., Jamin C., Le Corre R., Lydyard P.M., Youinou P. (1998) Ligation of CD5 on resting B cells, but not on resting T cells, results in apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **28**: 4170-4176.
114. Jamin C., Le Corre R., Lydyard P.M., Youinou P. (1996) Anti-CD5 extends the proliferative response of human CD5+ B cells activated with anti-IgM and interleukin-2. *Eur. J. Immunol.* **26**: 57-62.
115. Cantor G.H., Pritchard S.M., Dequiedt F., Willems L., Kettmann R., Davis W.C. (2001) CD5 is dissociated from the B-cell receptor in B cells from bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle: consequences to B-cell receptor-mediated apoptosis. *J. Virol.* **75**: 1689-1696.
116. Pers J.O., Berthou C., Porakishvili N., *et al.* (2002) CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **16**: 44-52.
117. Cioca D.P., Kitano K. (2002) Apoptosis induction by hypercross-linking of the surface antigen CD5 with anti-CD5 monoclonal antibodies in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **16**: 335-343.



118. Majolini M.B., D'Elia M.M., Galieni P., *et al.* (1998) Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. **91**: 3390-3396.
119. Curry M.P., Golden-Mason L., Nolan N., Parfrey N.A., Hegarty J.E., O'Farrelly C. (2000) Expansion of peripheral blood CD5+ B cells is associated with mild disease in chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **32**: 121-125.
120. Sampalo A., Lopez-Gomez M., Jimenez-Alonso J., Ortiz F., Samaniego F., Garrido F. (1993) CD5+ B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **66**: 260-268.
121. Campanero M.R., Pulido R., Ursa M.A., Rodriguez-Moya M., de Landazuri M.O., Sanchez-Madrid F. (1990) An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell. Biol.* **110**: 2157-2165.
122. Boyum A. (1974) Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*. **4**: 269-274.
123. Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
124. Eksioglu-Demiralp E., Alpdogan O., Aktan M., *et al.* (1996) Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*. **10**: 1331-1339.
125. Blin N., Stafford D.W. (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic. Acids Res.* **3**: 2303-2308.
126. Schneider S RDaEL. A Software for population genetics data analysis. Arlequin ver.2.000, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
127. Bernal A., Pastore R.D., Asgary Z., *et al.* (2001) Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood*. **98**: 3050-3057.
128. Fluckiger A.C., Rossi J.F., Bussel A., Bryon P., Banchereau J., Defrance T. (1992) Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood*. **80**: 3173-3181.



129. Neel B.G. (1997) Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 405-420.
130. Fais F., Ghiotto F., Hashimoto S., *et al.* (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* **102**: 1515-1525.
131. Bellosillo B., Dalmau M., Colomer D., Gil J. (1997) Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **89**: 3378-3384.
132. Ringshausen I., Schneller F., Bogner C., *et al.* (2002) Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood.* **100**: 3741-3748.
133. Carballo E., Colomer D., Vives Corrons JL, Blackshear PJ, Gil J. Phosphorylation of the MARCKS family of protein kinase C substrates in human B chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 1995;9:834-839.
134. Barragan M., Bellosillo B., Campas C., Colomer D., Pons G., Gil J. (2002) Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **99**: 2969-2976.
135. Cerutti A., Trentin L., Zambello R., *et al.* (1996) The CD5/CD72 receptor system is coexpressed with several functionally relevant counterstructures on human B cells and delivers a critical signaling activity. *J. Immunol.* **157**: 1854-1862.
136. Gary-Gouy H., Harriague J., Bismuth G., Platzer C., Schmitt C., Dalloul A.H. (2002) Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood.* **100**: 4537-4543.
137. Meffre E., Nussenzweig M.C. (2002) Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 11334-11339.
138. Healy J.L., Goodnow C.C. (1998) Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 645-670.
139. Alberola-Ila J., Takaki S., Kerner J.D., Perlmutter R.M. (1997) Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 125-154.
140. Long EO. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 875-904.



141. Fearon D.T., Carroll M.C. (2000) Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 393-422.
142. O'Rourke L., Tooze R., Fearon D.T. (1997) Co-receptors of B lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 324-329.
143. Gagro A., McCloskey N., Challa A., *et al.* (2000) CD5-positive and CD5-negative human B cells converge to an indistinguishable population on signalling through B-cell receptors and CD40. *Immunology.* **101**: 201-209.
144. Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., *et al.* (2004) Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by Ig V gene mutations. *Blood.* **103**: 375-382.
145. Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F. (2004) Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood.* **103**: 4389-4395.
146. Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., *et al.* (2004) ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **351**: 893-901.
147. Basu A. (1993) The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **59**: 257-280.
148. Cacace A.M., Guadagno S.N., Krauss R.S., Fabbro D., Weinstein IB. (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene.* **8**: 2095-2104.
149. Saijo K., Mecklenbrauker I., Schmedt C., Tarakhovsky A. (2003) B cell immunity regulated by the protein kinase C family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**: 125-134.
150. Hippen K.L., Tze L.E., Behrens T.W. (2000) CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J. Exp. Med.* **191**: 883-890.
151. Moore K.W., de Waal M., Coffman R.L., O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 683-765.
152. Levy Y., Brouet J.C. (1994) Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.* **93**: 424-428.



153. Fluckiger A.C., Garrone P., Durand I., Galizzi J.P., Banchereau J. (1993) Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **178**: 1473-1481.
154. Fluckiger A.C., Durand I., Banchereau J. (1994) Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Exp. Med.* **179**: 91-99.
155. Jurlander J., Lai C.F., Tan J, *et al.* (1997) Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. **89**: 4146-4152.
156. Sjoberg J., Aguilar-Santelises M., Sjogren A.M., *et al.* (1996) Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease. *Br. J. Haematol.* **92**: 393-400.
157. Fayad L., Keating M.J., Reuben J.M., *et al.* (2001) Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. **97**: 256-263.
158. Foey A.D., Brennan F.M. (2004) Conventional protein kinase C and atypical protein kinase Czeta differentially regulate macrophage production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology*. **112**: 44-53.
159. Foey A.D., Feldmann M., Brennan F.M. (2001) CD40 ligation induces macrophage IL-10 and TNF-alpha production: differential use of the PI3K and p42/44 MAPK-pathways. *Cytokine*. **16**: 131-142.
160. Foey A., Green P., Foxwell B., Feldmann M., Brennan F. (2002) Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **4**: 64-70.
161. Toker A., Meyer M., Reddy K.K., *et al.* (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.* **269**: 32358-32367.
162. Jain N., Zhang T., Kee W.H., Li W., Cao X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **274**: 24392-24400.
163. Vancurova I., Miskolci V., Davidson D. (2001) NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear Ikappa Balpha. *J. Biol. Chem.* **276**: 19746-19752.



164. Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. (2003) Interleukin-10 therapy: review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* **55**: 241-269.
165. Caponigro F., French R.C., Kaye S.B. (1997) Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anticancer Drugs*. **8**: 26-33.
166. Propper D.J., McDonald A.C., Man A., *et al.* (2001) Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J. Clin. Oncol.* **19**: 1485-1492.
167. Meyer T., Regenass U., Fabbro D., *et al.* (1989) A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int. J. Cancer*. **43**: 851-856.

